

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



**VYUŽITÍ RTUŤOVÝCH A AMALGAMOVÝCH ELEKTROD
K DETEKCI CARMUSTINU**

**The use of mercury and amalgam electrodes for
detection of Carmustine**

Tato práce byla finančně podporována MŠMT ČR
(projekt MSM 0021620857 a LC 06035)

Diplomová práce

Praha 2009

Vrzalová Lucie

Prohlášení

Tato diplomová práce byla vypracována na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze v letech 2008 – 2009 pod vedením školitele RNDr. Karoliny Peckové, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně a že jsem veškerou použitou literaturu řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 29. 4. 2009

.....
podpis

Předmětová hesla: analýza léčiv
destrukce
elektrochemie
průtokové systémy

Klíčová slova: Carmustin
DC voltametrie
diferenční pulsní voltametrie
průtoková injekční analýza
vysokoučinná kapalinová chromatografie
elektrochemická detekce
stříbrná tuhá amalgamová elektroda
visící rtuťová kapková elektroda

Úvodem bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Karolině Peckové, Ph.D. za odborné vedení. Současně bych ráda poděkovala i Mgr. Aleši Daňhelovi za ochotu ve sdílení vlastních laboratorních zkušeností a dále všem členům Katedry analytické chemie za všestrannou pomoc a cenné připomínky k mé práci.

V neposlední řadě děkuji svým rodičům, celé rodině i přátelům za podporu během celého studia.

Obsah

1. Úvod	10
1.1 Cíl práce	10
1.2 Vlastnosti studované látky	11
1.2.1. Fyzikálně – chemické vlastnosti, biologické účinky, vznik a výskyt	11
1.2.2 Analytické metody pro stanovení Carmustinu	13
1.2.2.1 Elektroanalytické metody	13
1.2.2.2 Chromatografické metody	14
1.2.2.3 Spektrometrické metody	15
1.2.2.4 Stanovení Carmustinu dle lékopisu	16
1.2.3 Stabilita Carmustinu	17
1.3 Použité pracovní elektrody	18
1.3.1 Stříbrná tuhá amalgamová elektroda	18
1.3.2 Visící rtuťová kapková elektroda	21
1.4. Použité metody	22
1.4.1 Diferenční pulsní voltametrie	22
1.4.2 DC voltametrie	22
1.4.3 Průtoková injekční analýza	22
1.4.4 HPLC s elektrochemickou detekcí	23
2. Experimentální část	24
2.1 Reagencie	24
2.1.1 Studovaná látka	24
2.1.2 Reagencie pro přípravu mobilních fází	24
2.1.3 Reagencie při destrukci	25
2.1.4 Další chemikálie	25
2.2 Aparatura	26
2.3 Použité pracovní elektrody	28
2.3.1 Stříbrné tuhé amalgamové elektrody	28
2.3.2 Visící rtuťová kapková elektroda	29
2.4 Pracovní postupy	30
2.4.1 Voltametrická analýza léčiva	30

2.4.2 Analýza léčiva dle lékopisu	30
2.4.3 Průtoková injekční analýza	31
2.4.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	31
2.4.5 Chemická destrukce Carmustinu manganistanem draselným	32
2.5 Stálost zásobního roztoku Carmustinu	34
2.5.1 Stálost zásobního roztoku Carmustinu ve vodě	34
2.5.2 Stálost zásobního roztoku Carmustinu v ethanolu	36
3. Voltametrické stanovení Carmustinu	38
4. Spektrofotometrické stanovení Carmustinu	41
5. Analýza Carmustinu v lékové formě	43
5.1 Stanovení metodou DPV a DCV na HMDE	43
5.2 Stanovení dle lékopisu	47
6. Stanovení Carmustinu průtokovou injekční analýzou	48
6.1 Stanovení Carmustinu při dávkování automatickým dávkovačem	48
6.2 Stanovení Carmustinu za použití ručního dávkování	52
6.2.1 Optimalizace metody	53
6.2.1.1 Vliv pH nosného elektrolytu a potenciálu vloženého na pracovní elektrodu	53
6.2.1.2 Vliv průtokové rychlosti	55
6.2.1.3 Vliv množství rtuti	56
6.2.2 Opakovatelnost měření při FIA-ED	58
6.2.3 Koncentrační závislost	60
7. Stanovení Carmustinu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií	64
7.1 Optimalizace metody	64
7.1.1 Mobilní fáze	64
7.1.2 Vliv pH mobilní fáze a potenciálu vloženého na pracovní elektrodu	69
7.1.3 Vliv průtokové rychlosti	71
7.1.4 Vliv dávkovaného objemu	76
7.1.5 Vliv vzdálenosti od ústí výtokové trubičky	79
7.1.6 Vliv množství rtuti	81
7.2 Koncentrační závislost	83
7.2.1 Velkoplošná meniskem modifikovaná stříbrná tuhá amalgamová elektroda	83

7.2.2 Velkoplošná leštěná stříbrná tuhá amalgamová elektroda	88
7.2.3 Velkoplošná filmová stříbrná tuhá amalgamová elektroda	92
7.2.4 Klasická meniskem modifikovaná stříbrná tuhá amalgamová elektroda	96
7.2.5 Koncentrační závislost měřená metodou HPLC-UV	100
7.2.6 Porovnání elektrochemické a UV detekce	104
8. Monitorování chemické destrukce Carmustinu	106
8.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	107
8.2 Diferenční pulsní voltametrie	111
9. Závěr	114
10. Seznam použité literatury	116

Seznam použitých zkratk a symbolů

A	absorbance
A_{230}	absorbance při vlnové délce maxima 230 nm
A_p	plocha píku
BCNU	Carmustin
BR pufr	Brittonův – Robinsonův pufr
c	molární koncentrace
C.A.S.	Chemical Abstract Service
CV	cyklická voltametrie
DAD	diode array detektor
DCV	DC (direct current) voltametrie
DNA	deoxyribonukleonová kyselina
DPV	diferenční pulsní voltametrie
DPP	diferenční pulsní polarografie
ED	elektrochemická detekce
E_{in}	kladnější regenerační potenciál
E_{fin}	zápornější regenerační potenciál
E_p	potenciál píku
E_v	potenciál vlny
FDA	Food and Drug Administration
FIA	průtoková injekční analýza
GC	plynová chromatografie
HMDE	visící rtuťová kapková elektroda
h_p	výška píku
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IARC	International Agency for Research on Cancer
I_{lim}	limitní proud
I_p	proud píku
i.v.	intravenózně
L_D	mez detekce
LD ₅₀	smrtelná dávka pro daného jedince v 50 % případů

LDLO	nejnižší smrtelná dávka
L_Q	mez stanovitelnosti
$L_{1/2}$	interval spolehlivosti
m-AgSAE	meniskem modifikovaná stříbrná tuhá amalgamová elektroda
MeSAE	kovová tuhá amalgamová elektroda
MF-AgSAE	filmová stříbrná tuhá amalgamová elektroda
M_r	relativní molekulová hmotnost
MS	hmotnostní spektroskopie
NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid
NPP	normální pulsní polarografie
pH	záporný dekadický logaritmus koncentrace oxoniových iontů
p-AgSAE	leštěná stříbrná tuhá amalgamová elektroda
RNA	ribonukleonová kyselina
s	směrodatná odchylka mediánu
s_r	relativní směrodatná odchylka mediánu
t	čas
$t_{10\%}$	čas, za něž dojde k degradaci 10 % látky
$t_{50\%}$	čas, za něž dojde k degradaci 50 % látky
UV/VIS	ultrafialová a viditelná spektroskopie
v_{sc}	rychlost scanu
w_b	šířka píku
ε	molární absorpční koeficient
λ	vlnová délka
λ_{max}	vlnová délka absorpčního maxima

1. Úvod

1.1 Cíl práce

Tato diplomová práce byla vypracována v rámci širšího projektu, řešeného na Katedře analytické chemie, jenž se věnuje studiu elektrochemického chování karcinogenních a genotoxických látek.

Diplomová práce navazuje na bakalářskou práci, ve které jsem se zabývala studiem elektrochemického chování protinádorového léčiva Carmustinu s využitím diferenční pulsní voltametrie (DPV) a DC voltametrie (DCV) na meniskem modifikované stříbrné tuhé amalgamové elektrodě (m-AgSAE) a na visící rtuťové kapkové elektrodě (HMDE) (viz kap. 3).

Vyvinuté voltametrické metody byly v předkládané diplomové práci porovnány se spektrofotometrickým stanovením (kap. 4) a využity ke stanovení obsahu Carmustinu v lékových formách. Tyto výsledky byly porovnány se spektrofotometrickým stanovením dle lékopisu (kap. 5).

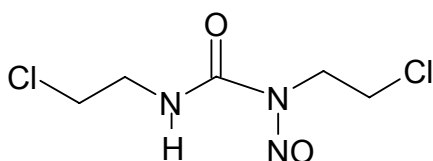
Dalším cílem práce byl vývoj elektroanalytických metod pro stanovení Carmustinu v průtokových metodách (FIA, HPLC) s využitím ampérometrické detekce na stříbrných tuhých amalgamových elektrodách (AgSAE) s různou úpravou povrchu: Meniskem modifikované (m-AgSAE), leštěné (p-AgSAE) a filmové (MF-AgSAE). Cílem práce bylo nalezení vhodných podmínek pro stanovení Carmustinu s použitím těchto elektrod (kap. 6, 7).

Vyvinuté voltametrické a ampérometrické metody byly následně použity pro kontrolu účinnosti destrukce Carmustinu oxidací manganistanem draselným (kap. 8).

1.2 Vlastnosti studované látky

1.2.1 Fyzikálně – chemické vlastnosti, biologické účinky, vznik a výskyt

Carmustin (BCNU, 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosomočovina), jehož struktura je uvedena na Obr. 1.1, je cytostatikum ze skupiny nitrosomočovin. V čisté formě se jedná o nažloutlý zrnitý prášek. Je málo rozpustný ve vodě, velmi snadno rozpustný v etheru a v dichlormethanu, snadno rozpustný v ethanolu. Taje asi při 31°C, za rozkladu¹.



Obr. 1.1

Strukturní vzorec Carmustinu.

CAS Registry Number: 154-93-8

Sumární vzorec: C₅H₉Cl₂N₃O₂

Relativní molekulová hmotnost: 214,05

Teplota tání: 30 – 32 °C

Hustota: 1,46 ± 0,1 g ml⁻¹

Rozpustnost ve vodě²: 4000 mg l⁻¹ při 25 °C

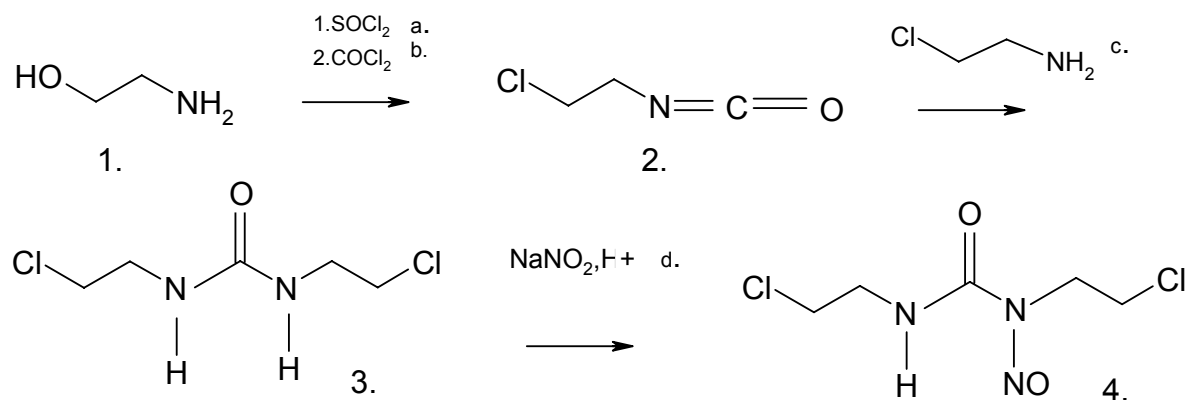
Pro použití ve farmacii byl schválen v roce 1977 Americkým úřadem pro kontrolu potravin a léků (FDA)³. Má převážně alkylující mechanismus cytostatického účinku, alkyluje DNA a RNA. Od klasických alkylačních látek se liší tím, že metabolickou degradací vzniká kromě alkylující skupiny ještě isokyanátová struktura (R–N=C=O), která reaguje s aminoskupinami aminokyselin a inhibuje „opravu“ poškozené DNA. Karbaminací aminokyselin v molekulách bílkovin inhibuje i některé důležité enzymy. Rychle podléhá biotransformaci, jeho metabolity jsou rovněž cytotoxické. Snižuje koncentraci NAD⁺ v nádorových buňkách a zasahuje do některých metabolických pochodů (inhibuje formiminotransferázu)⁴. Toxické účinky látky jsou shrnuty v Tab. 1.1.

Tab. 1.1*Toxikologické vlastnosti látky⁵.*

Akutní toxicita
LD ₅₀ (orálně, krysa) = 30 – 34 mg kg ⁻¹ LD ₅₀ (intraperitoneálně, myš) = 26 mg kg ⁻¹ LD ₅₀ (subkutánně, myš) = 24 mg kg ⁻¹ LD ₅₀ (orálně, myš) = 19 – 25 mg kg ⁻¹ LDLO (intravenózně, dítě) = 78 mg kg ⁻¹ LDLO (parenterálně, žena) = 1 566 mg kg ⁻¹
Chronická toxicita
<i>Karcinogenita:</i> Dle seznamu karcinogenů IARC patří do skupiny 2A – pravděpodobně karcinogenní pro člověka (cit. ⁶). <i>Mutagenita:</i> Carmustin je považován za mutagen. <i>Teratogenita:</i> Může vyvolat vrozené malformace plodu. <i>Riziko pro reprodukci:</i> Může vyvolat poškození dědičných vlastností, poškodit reprodukční schopnost.

Z fyzikálně chemických vlastností je důležitá termolabilita a značná liposolubilita, která umožňuje snadný průnik hemoencefalickou bariérou. Právě tato vlastnost umožňuje lék použít u mozkových nádorů a v léčbě leukemického postižení centrálního nervového systému⁷.

Carmustin se podává buď i.v. kapající infuzí nebo ve formě gelového implantátu, který je implantován do těla a nazývá se Gliadel implantát. Gliadel implantát je nový způsob podávání Carmustinu lidem s jistými druhy mozkových nádorů. Jsou to disky, obsahující Carmustin, které se po umístění do mozku pomalu rozpouští. Jakmile se implantát rozpustí, Carmustin se začne uvolňovat a léčit nádorové buňky, které nemohou být odstraněny operací. Gliadel implantáty jsou licencované ve Velké Británii pro zacházení s gliomy, které byly diagnostikovány (primární gliom) a pro gliomy, které se vrátily potom, co byly ošetřeny (vracející se gliom)⁸. Carmustin se připravuje nitrosací *N,N'*-bis(2-chlorethyl)močoviny. Močovinu lze získat adicí 2-chlorethylaminu na 2-chlorethylisokyanát⁹. Schéma syntézy je znázorněno na Obr. 1.2.



Obr. 1.2

Syntéza Carmustinu.

reaktanty a produkty

1. 2-hydroxyethylamin
2. 2-chlorethylisokyanát
3. N, N'-bis(2-chlorethyl)močovina
4. Carmustin

činidla

- a. chlorid sulfonylu
- b. chlorid karbonylu
- c. 2-chlorethylamin
- d. dusitan sodný v H^+ prostředí

1.2.2 Analytické metody pro stanovení Carmustinu

1.2.2.1 Elektroanalytické metody

Ke stanovení Carmustinu je možné použít polarografické a voltametrické metody, neboť zkoumaná látka obsahuje *N*-nitrososkupinu, která je v potenciálovém oknu rtuťové elektrody elektrochemicky aktivní a předpokládá se její snadná redukce na hydroxylamin a v kyselém prostředí až na amino skupinu¹⁰.

V práci¹⁰ byl Carmustin stanovován metodou diferenční pulsní polarografie (DPP) na rtuťové kapkové elektrodě s kontrolovanou dobou kapky. Ukázalo se, že při pH 2,5 se objevuje jednoduchá pík A, jehož půlvalnový potenciál, šířka a výška závisí na pH, a který odpovídá redukci Carmustinu. Při vyšších hodnotách pH byl pík A stále přítomen, ale při negativnějších potenciálech se objevil druhý pík B, jehož výška a šířka také závisela na pH, ale pozice byla téměř konstantní. Pík B odpovídal redukci Carmustinu v reakci, která nevyžadovala přítomnost H^+ iontů.

V práci¹¹ je popsáno stanovení Carmustinu metodou DPP na rtuťové kapkové elektrodě s kontrolovanou dobou kapky. Při cyklické voltametii (CV) na HMDE se

objevil dobře vyvinutý pík odpovídající katodické redukci, ale pík odpovídající oxidaci pozorován nebyl. To indikuje ireverzibilní děj redukce Carmustinu. Mechanismus redukce *N*-nitrososkupiny je dvou- či čtyřelektronový proces, který závisí na pH základního elektrolytu. Při pH menším jak 6,0 redukce probíhá ve dvou krocích; první odpovídá dvouelektronové redukci na hydroxylamin a druhý krok dvouelektronové redukci na amin. Při pH roztoku vyšším jak 11,0 je redukce jednostupňový proces, který odpovídá dvouelektronové redukci na hydroxylamin.

Elektrochemická detekce Carmustinu byla také použita při stanovení metodou HPLC¹².

1.2.2.2 Chromatografické metody

Chromatografické metody jsou běžně používány vzhledem k jejich mimořádné selektivitě, citlivosti a vhodnosti pro sériové analýzy. K jejich nevýhodám patří vysoká pořizovací a provozní cena spojená s velkou spotřebou těkavých a drahých organických rozpouštědel.

V praxi se běžně používá stanovení Carmustinu metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) na reverzní fázi s mobilní fází methanol:voda¹²⁻¹⁴ za použití spektrofotometrické a elektrochemické detekce. Některá stanovení Carmustinu metodou HPLC jsou shrnuta v Tab. 1.2.

Objevilo se i stanovení Carmustinu v nemocničních odpadních vodách a čistírně odpadních vod¹⁵. Analýza byla provedena za použití extrakce tuhou fází s následnou HPLC separací a detekcí gradientovou elucí s DAD detektorem a fluorescenčním detektorem. Dosažený limit HPLC detekce při 231 nm byl $2,3 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ a limit detekce po extrakci byl $9,3 \cdot 10^{-9} \text{ mol l}^{-1}$.

Běžně se užívá metoda plynové chromatografie (GC). V práci¹⁶ byl Carmustin stanoven spolu s Lomustinem v plazmě králíků s kalibrační závislostí lineární v rozsahu $1,4 \cdot 10^{-8} - 2,3 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ po předchozí extrakci benzenem. Zároveň byla zjišťována stabilita sloučenin v roztoku při různých teplotách. Ukázalo se, že obě sloučeniny jsou stabilní v benzenu nebo acetonu (při teplotě 4 – 37 °C), ale nestabilní v plazmě, i když je chlazená.

Při stanovení Carmustinu metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí GC-MS¹⁷ byla po předchozí derivatizaci s anhydridem kyseliny trifluoroctové kalibrační závislost lineární v rozsahu $4,7 \cdot 10^{-9} - 1,4 \cdot 10^{-8} \text{ mol l}^{-1}$.

V práci¹⁸ byl Carmustin stanovován metodou plynové chromatografie v mozkových tkáních. Minimální zjiřitelné množství Carmustinu v každém vzorku bylo 20 ng po extrakci ethylacetátem a derivatizaci anhydridem kyseliny trifluoroctové.

Tab. 1.2

Vybraná stanovení Carmustinu metodou HPLC.

typ kolony (sorbent)	mobilní fáze	detekce	$L_D [\text{mol l}^{-1}]$	citace
Ultrasphere ODS (C18)	MeOH:voda (50:50)	UV,ED	$4,7 \cdot 10^{-7}^b$	12
(C18) ^a	MeOH:voda (85:15)	UV	$9,3 \cdot 10^{-5}^b$	13
Hypersil ODS2 (C18)	MeOH:voda (50:50)	UV	$5 \cdot 10^{-6}$	14
Nucleosil (C18)	MeOH:fosfátový pufr	UV	$2,3 \cdot 10^{-6}$	15

ED – elektrochemická detekce, ^a – kolona nespecifikována, ^b – dolní hranice kalibrační závislosti, detekční limit L_D neuveden

1.2.2.3 Spektrometrické metody

Carmustin lze stanovit přímo měřením absorbance v ultrafialové oblasti spektra¹⁹ nebo po převedení na barevné látky. Carmustin poskytuje v methanolu pás K s maximem při 230 nm a pás B, charakterizovaný třemi absorpčními maximy v oblasti vlnových délek kolem 400 nm²⁰. V práci²¹ bylo provedeno stanovení protinádorových látek obsahujících nitrososkupinu po barevné reakci s ceftizoximem. Mechanismus reakce je založen na reakci nitrososkupiny s aminoskupinou aminothiazol-syn-oxyiminového řetězce při diazotaci.

Spektrofotometrická (UV/VIS) detekce se běžně používá ve spojení s HPLC.

Výhodou spektrofotometrie je jednoduchost, snadná dostupnost instrumentace i poměrně nízká cena analýzy.

1.2.2.4 Stanovení Carmustinu dle lékopisu¹

Carmustin je zapsán v Českém lékopise, kde jsou popsány metody pro stanovení čistoty a obsahu v lékových formách.

Při zkoušce na čistotu se provádí tenkovrstvá chromatografie za použití vrstvy silikagelu a mobilní fáze methanol:dichlormethan. Možnou nečistotou je 1,3-bis(2-chlorethyl)močovina.

Obsah Carmustinu je stanovován spektrofotometricky při vlnové délce absorpčního maxima $\lambda_{max} = 230 \text{ nm}$.

1.2.3 Stabilita Carmustinu

Carmustin je chemicky nestabilní sloučenina. Čistou látku, rozpuštěnou v ethanolu je třeba uchovávat za nepřístupu světla v chladničce, kdy je stabilní po dobu 30 dní. Faktorů ovlivňujících stabilitu roztoků je celá řada:

- **Vliv pH** – degradace vodných roztoků s maximální stabilitou v rozmezí pH 3,0 – 5,0, odpovídající $t_{10\%}$ 5 – 6 hodin²².
- **Vliv teploty** – degradace je teplotně závislá, v rozsahu poločasu rozpadu od 52 minut při 37 °C do 600 hodin při 0 °C ve fosfátovém pufru o pH 7,4 (cit^{23–26}). Rychlost rozkladu Carmustinu je výrazně zvýšená při tělesné teplotě (37 °C) a v zásadě neovlivněna typem rozpouštědla při teplotě pokojové (19,5 °C)^{23,27}.
- **Vliv světla** – Carmustin je velice citlivý na světlo, vystavení světlu zvyšuje degradaci Carmustinu na 1,3-bis(2-chloroethyl)močovinu, proto je doporučováno roztok chránit před světlem nebo použít kontejnery s červeně zbarvenými LD-polyethylenovými vaky. V okamžiku, kdy je Carmustin chráněn v těchto plastových vácích a vystaven osvětlení 1500 lux, degradace je téměř stejná jako za tmy²².
- **Sorpce plastem** – Carmustin je lipofilní, rozdělovací koeficient oktanol/voda (P) je 34,7 a relativní molekulová hmotnost 214,05. Tyto charakteristiky indikují interakci mezi Carmustinem a plastem, proto by měly být použity skleněné nádoby. Stupeň sorpce závisí na typu použitého plastového materiálu, přičemž je minimalizována užitím nádob s vnitřním polyethylenovým povlakem²². Třívrstvé plastové vaky s nejvnitřnější vrstvou vyrobenou z polyethylenu jsou vhodnější než skleněné nádoby, protože jsou lehčí, snadnější na dopravu a uskladnění a mají dobrou mechanickou odolnost²⁸.

Dále bylo zjištěno, že se Carmustin rychle rozkládá ve vodných roztocích jako je 5% injekční roztok dextrózy a 0,9% injekční roztok chloridu sodného^{29,30}. V i.v. příměsích je Carmustin adsorbován na vnitřní povrch kontejnerů vyrobených z polyvinylchloridu²⁹, ethylenvinyl acetátu²² nebo polyuretanu²². Kontejnery složené ze šesti vrstev, s nejvnitřnější vrstvou vyrobenou z polyethylenu mohou být použity pro uskladnění Carmustinu po stejný časový úsek jako skleněné kontejnery – 6 hodin při 22 °C a až 48 hodin při 4 °C³¹.

1.3 Použité pracovní elektrody

1.3.1 Stříbrná tuhá amalgamová elektroda

Úspěch voltametrického a ampérometrického stanovení ovlivňuje kvalita použité indikační elektrody, která je v těsném kontaktu s analyzovaným prostředím. S ohledem na toxicitu rtuti omezuje legislativa Evropské Unie³² práci s touto látkou, proto jsou vyvíjena jiná netoxická elektroanalytická čidla na bázi nových druhů kapalných, pastových a pevných elektrod z netradičních materiálů^{33–36}. Tuhé amalgamové elektrody, které byly vyvinuty na Ústavu fyzikální chemie a elektrochemie Jaroslava Heyrovského^{37,38}, mají celou řadu předností:

- ✓ Jsou netoxické a tudíž přívětivé k životnímu prostředí.
- ✓ Dostupné potenciálové okno je srovnatelné s visící rtuťovou kapkovou elektrodou.
- ✓ Je u nich jednoduchá elektrochemická předúprava.
- ✓ Jsou mechanicky robustní a tudíž kompatibilní s HPLC a FIA.
- ✓ Jsou vhodné k selektivní detekci redukovatelných látek.
- ✓ Dlouhodobou stabilitu odezvy.
- ✓ Snadnou manipulaci při využití v terénních měřeních.
- ✓ Nízké pořizovací náklady.

Používané amalgamy představují čistší obdobu zubních amalgamů, o nichž je známo, že jsou zcela netoxické. Při jejich případné modifikaci rtutí je množství kovové rtuti na povrchu velmi malé. Postupem času se podložka elektrody s kapalnou rtutí mění v netoxický pevný amalgam.

Podle stavu povrchu lze kovové tuhé amalgamové elektrody (MeSAE) rozdělit na následující typy:

leštěná – pevná amalgamová elektroda neobsahující kapalnou rtuť (p-MeSAE);

filmová – leštěná MeSAE pokrytá rtuťovým filmem (MF-MeSAE);

menisková – leštěná MeSAE pokrytá rtuťovým meniskem (m-MeSAE);

pastová – pracovní elektroda na bázi jemného prášku pevného amalgamu a kapalného oleje (MeSA-PE);

kompozitní – pracovní elektroda na bázi jemného prášku pevného amalgamu a tuhého polymeru (MeSA-CE).

Z analytického hlediska se nejlepšími MeSAE ukázaly elektrody modifikované rtutí, a to meniskem (m-MeSAE), nebo filmem (MF-MeSAE). Jejich kapalný povrch je ideálně rovný a stejnorodý, což dovoluje vyloučit snad největší problém pevných elektrod – mechanickou regeneraci a často s tím svázanou nevyhovující opakovatelnost paralelních měření. Elektrochemické obnovení povrchu meniskové nebo filmové elektrody před každým měřením, zvláště při využití počítačem řízeného analyzátoru (kde se dá tato operace snadno začlenit do měřicího programu), dovoluje dosáhnout relativní směrodatné odchylky při opakovaných měřeních menší než 2 – 3 %. Tato skutečnost a mechanická odolnost MeSAE je dovoluje použít v průtokovém systému, v automatickém systému s autosamplrem, v ampérometrickém detektoru v HPLC apod³⁹.

Nejosvědčenějším kovem pro přípravu MeSAE je stříbro, které je jedním z nejpoužívanějších materiálů pro výrobu elektrod, zvláště pokrytých filmem nebo meniskem rtuti. Důležité je, že stříbro rozpuštěné ve rtuti prakticky netvoří intermetalické sloučeniny s jinými kovy, na rozdíl od Pt, Au, Cu⁴⁰. Film Hg na Ag je mnohem stejnorodější než na Pt a Ir, i když je jeho životnost menší.

Dle úpravy povrchu AgSAE lze rozlišit rtuťovým meniskem modifikovanou (m-AgSAE), filmovou (MF-AgSAE) a leštěnou (p-AgSAE) elektrodu, která neobsahuje kapalnou rtuť.

Nejčastěji se používá m-AgSAE, rozsah stanovitelnosti pomocí této elektrody je v porovnání s visící rtuťovou kapkovou elektrodou (HMDE) zpravidla o koncentrační řád nižší, avšak je dostatečný pro řadu environmentálních aplikací^{34,41}.

Tato elektroda se svým chováním (nedochází-li ke specifické interakci mezi stříbrem z elektrody a složkami roztoku) podobá visící rtuťové kapkové elektrodě; potenciály píků a proudy pozadí jsou na obou elektrodách pro řadu anorganických iontů a organických analytů téměř totožné³⁷.

Pro úspěšnou aplikaci AgSAE jsou nutné tři základní operace: Úprava povrchu (amalgamace pro m-AgSAE, leštění pro p-AgSAE, vytvoření rtuťového filmu pro MF-AgSAE), aktivace a regenerace.

Amalgamace m-AgSAE se provádí jednou týdně, dále vždy při zhoršení citlivosti či reprodukovatelnosti měření či nepřítomnosti menisku kapalného amalgamu na povrchu elektrody. Do lahvičky se dá 1 – 2 ml kovové rtuti a 5 – 10 ml deionizované vody. Dolní část elektrody se ponoří do rtuti a intenzivně se lahvičkou se rtutí přibližně 15 s míchá. Elektroda se následně opláchne deionizovanou vodou a zkontroluje se přítomnost menisku rtuti na dolní části elektrody.

Leštění p-AgSAE se provádí pomocí vlhké aluminy o velikosti částic 1,1 μm po dobu 1 – 3 min.

Vytvoření rtuťového filmu pro MF-AgSAE se provádí elektrochemickou cestou z roztoku obsahujícího rtuťnaté ionty.

Aktivace, trvající 5 minut, se provádí vždy na začátku pracovního dne, po přestávkách v měřeních delších než 1 hodinu a po amalgamaci, vytvoření filmu nebo leštění. Aktivace se provádí v roztoku 0,2 mol l^{-1} KCl, který není probubláván dusíkem, při vloženém napětí -200 mV. Během aktivace se z povrchu AgSAE odstraňují oxidy a adsorbované látky, čímž se zlepšuje citlivost a reprodukovatelnost následných měření.

Regenerace, trvající asi 30 s, se provádí v analyzovaném roztoku před každým voltametrickým měřením automaticky, a to vždy po spuštění měřicího programu. Tím se zpravidla docílí dobré opakovatelnosti výsledků. Pro obnovení povrchu AgSAE se na elektrodu vkládá po dobu 20 – 30 s potenciál o 50 – 100 mV pozitivnější než potenciál vylučování vodíku nebo rozkladu základního elektrolytu. Při tomto potenciálu dochází k redukci oxidů kovů tvořících pevný amalgam (Hg a Ag) a k odstranění adsorbovaných látek. Současně probíhá akumulace kovů přítomných v analyzovaném roztoku. K zabránění nekontrolovaného procesu akumulace zahrnuje měřicí program skokové změny potenciálu z negativních hodnot na pozitivnější, při nichž dochází k rozpouštění naakumulovaných kovů⁴².

1.3.2 Visící rtuťová kapková elektroda

Rtuť jako elektrodový materiál má z hlediska elektrochemické analýzy dvě velice významné přednosti oproti tuhým materiálům:

- ✓ Její povrch je homogenní, atomicky hladký a lze ho podle potřeby snadno obnovovat, takže každou analýzu je možno provádět vždy s novým, reprodukovatelně obnovovaným povrchem elektrody.
- ✓ Vysoká hodnota přepětí vodíku umožňuje pracovat s elektrodou v neutrálních roztocích při velmi negativních potenciálech, kdy lze vyloučit i např. alkalické kovy, aniž je reakce překryta redukcí vodíkového iontu.

U HMDE se analýza provádí na kapce, jejíž povrch není v průběhu měření obnovován. Před další analýzou se kapka odklepne elektronicky řízeným klepátkem, které lehkým úderem na kapiláru odtrhne starou kapku a vytvoří se kapka nová.

Výhodou HMDE je oproti klasické rtuťové kapkové elektrodě:

- ✓ Menší spotřeba rtuti.
- ✓ Menší nabíjecí proud, neboť povrch kapky se v průběhu jednoho měření neobnovuje.

Nevýhodou jsou však:

- ✗ Vyšší problémy s pasivací vzhledem k neobnovovanému povrchu elektrody v průběhu jednoho voltametrického záznamu⁴³.

1.4. Použité metody

1.4.1 Diferenční pulsní voltametrie

DPV patří k nejcitlivějším elektroanalytickým metodám, při kterých se na potenciál, který se lineárně mění s časem, vkládá napěťový puls o amplitudě 10 až 100 mV a době trvání řádově desítek milisekund. Registruje se rozdíl proudů změřených těsně před vložením pulsu a na jeho konci. Závislost rozdílu proudu na potenciálu má tvar píku. Poloha píku na potenciálové ose je dána kvalitou analytu a jeho výška závisí na koncentraci depolarizátoru.

Pomocí DPV lze stanovit koncentrace analytů až do 10^{-8} mol l^{-1} u látek redukujících se reverzibilně i u látek, které se redukují ireverzibilně je mez stanovitelnosti poněkud vyšší.

1.4.2 DC voltametrie

U DCV se potenciál vkládaný na pracovní elektrodu lineárně mění s časem (roste či klesá). Tato metoda většinou využívá větších rychlostí změny potenciálu na čase. Voltametrická křivka má tvar vlny až sigmoidálního píku v závislosti na velikosti plochy elektrody, rychlosti scanu a rychlosti elektrodové reakce. Potenciál vrcholu píku se zpravidla blíží půlvlnovému potenciálu a jeho výška také závisí na koncentraci depolarizátoru.

1.4.3 Průtoková injekční analýza

Při této metodě se malý objem analyzovaného roztoku nastříkuje do proudu nosného roztoku, kterým se může upravit jeho složení a po promíchání je analyt detekován vhodnou detekční metodou.

Mezi nejčastější přednosti průtokové injekční analýzy (FIA) ve stopové analýze patří práce v uzavřeném systému, která snižuje pravděpodobnost kontaminace vzorku v průběhu jeho předběžné úpravy i při vlastní analýze. Vysoká reprodukovatelnost časových změn koncentračních gradientů složek nosného roztoku a stanovovaného

analytu umožňuje efektivně využít při FIA i takové chemické reakce, jejichž použití ve stacionárním uspořádání by bylo problematické.

1.4.4 HPLC s elektrochemickou detekcí

HPLC je pokročilou a instrumentálně náročnou technikou kapalinové chromatografie. V HPLC je dosahováno vysoké účinnosti separačního procesu použitím kolon naplněných stacionární fází o malé a dobře definované velikosti částic. Separační kolony pro HPLC se vyznačují vysokou hustotou a homogenitou náplně stacionární fáze a tedy i velkým hydrodynamickým odporem. Pro dosažení dostatečného průtoku mobilní fáze je nutno aplikovat přetlak jednotek až desítek MPa. K detekci látek se nejčastěji používá spektrometrický UV/VIS detektor, dále fluorimetrický, hmotnostní a vodivostní detektor. Pro detekci látek, které je možno elektrochemicky redukovat či oxidovat se používají detektory elektrochemické, nejčastěji ampérometrické, často v kombinaci se spektrometrickým UV/VIS detektorem.

2. Experimentální část

2.1 Reagencie

2.1.1 Studovaná látka

Zásobní roztoky Carmustinu (čistota 99 %, Sigma-Aldrich, Praha, ČR) o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ byly připraveny rozpuštěním navážky 5,35 mg látky v 25 ml deionizované vody (pro voltametrii a FIA s autosamplerem) nebo ethanolu (pro FIA s ručním dávkováním a pro HPLC) pomocí ultrazvuku. Roztoky byly uchovávány ve tmě v chladničce. Roztoky o nižších molaritách byly připravovány přesným ředěním zásobního roztoku látky deionizovanou vodou nebo ethanolem (Uvasol® Ethanol pro spektroskopii, Merck).

Analyzované léčivo byl prášek Carmustinu (BiCNU Carmustinum®, Bristol-Myers, Itálie, 100 mg), který byl dodán spolu s ethanolem (3 ml). Prášek dle údajů výrobce obsahuje pouze Carmustin.

2.1.2 Reagencie pro přípravu mobilních fází

Použité chemikálie: kyselina boritá, hydroxid sodný, dihydrogenfosforečnan sodný (vše čistoty p.a., Lachema Brno, ČR), kyselina fosforečná (85%), kyselina octová (99,8%) (obě Lach-Ner Neratovice, ČR), methanol (LiChrosolv® Gradient grade pro chromatografii, Merck).

Brittonovy – Robinsonovy tlumivé roztoky⁴⁴ o příslušném pH byly připraveny smísením $0,2 \text{ mol l}^{-1}$ NaOH s roztokem obsahujícím kyselinu boritou, fosforečnou a octovou, každou o koncentraci $0,04 \text{ mol l}^{-1}$.

Fosfátové tlumivé roztoky o pH 3,0 byly připraveny smísením dihydrogenfosforečnanu sodného a kyseliny fosforečné ($0,01 \text{ mol l}^{-1}$ tlumivý pufr: $0,009 \text{ mol l}^{-1}$ dihydrogenfosforečnan sodný a $0,001 \text{ mol l}^{-1}$ kyselina fosforečná; $0,04 \text{ mol l}^{-1}$ pufr: $0,036 \text{ mol l}^{-1}$ dihydrogenfosforečnan sodný a $0,004 \text{ mol l}^{-1}$ kyselina fosforečná).

2.1.3 Reagencie při destrukci

Zásobní roztok Carmustinu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním navážky 5,35 mg látky v 25 ml v koncentrované kyselině octové (p.a., 99,8%, Lach-Ner Neratovice, ČR).

Zásobní roztok kyseliny sírové o koncentraci 2 mol l^{-1} byl připraven z 10,7 ml koncentrované kyseliny sírové (p.a., 95 – 97%, Merck) a doplněn do 100 ml deionizovanou vodou.

Zásobní roztok manganistanu draselného o koncentraci $0,2 \text{ mol l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním navážky 1,58 g (p.a., Lachema Brno, ČR) v 50 ml deionizované vody.

Zásobní roztok kyseliny šťavelové koncentraci 1 mol l^{-1} byl připraven rozpuštěním navážky 6,3 g látky (p.a., Lachema Brno, ČR) v 50 ml deionizované vody. Pro rozpuštění byla použita ultrazvuková lázeň.

Zásobní roztok hydroxidu sodného o koncentraci 10 mol l^{-1} byl připraven rozpuštěním navážky 19,95 g (p.a., Lachema Brno, ČR) v 50 ml deionizované vody.

Dále byl použit práškový zinek (99,9%).

2.1.4 Další chemikálie

Pro aktivaci elektrody byl používán $0,2 \text{ mol l}^{-1}$ roztok chloridu draselného (p.a., Lachema Brno, ČR).

Pro přípravu všech roztoků byla používána deionizovaná voda (Millipore Milli-Q plus systém, Millipore, USA). Používané roztoky byly uchovávány ve skleněných nádobách.

Kyslík byl ze studovaných roztoků odstraňován pětiminutovým probubláním dusíkem čistoty 4.0 (Linde, Praha, ČR).

2.2 Aparatura

pH stanovení: Přesná hodnota pH byla měřena digitálním pH-metrem Jenway 4330 (Jenway Essen, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou (typ 924 005). pH-metr byl kalibrován standardními vodnými pufrý (Sevac, Praha, ČR) za laboratorní teploty.

Měření stability zásobního roztoku: Spektrofotometrické měření bylo prováděno na přístroji Hewlett-Packard 8453 Diode-Array Spectrophotometer (Nizozemsko) s ovládacím programem UV-Visible ChemStation verze 9.01 v křemenných kyvetách měrné tloušťky 1 mm a 1 cm.

Elektrochemické stanovení ve stacionárním systému: Při voltametrických stanoveních byla použita sestava Eko-Tribo Polarograf se softwarem PolarPro verze 5.1 (EkoTrend-Plus, ČR), pracující v operačním systému Windows XP 2000 (Microsoft Corporation, USA).

Jednotlivá měření byla prováděna v tříelektrodovém zapojení. Jako referentní elektroda byla použita argentchloridová elektroda ($3 \text{ mol l}^{-1} \text{ KCl}$). Jako pomocná elektroda byla použita platinová elektroda (Monokrystaly, Turnov). Použité pracovní elektrody jsou charakterizovány v kap. 2.3. Při technice DPV byly na elektrody vkládány pulsy o šířce 80 ms a modulační amplitudě -50 mV . Při technice DPV a DCV byla použita rychlost nárůstu potenciálu 20 mV s^{-1} .

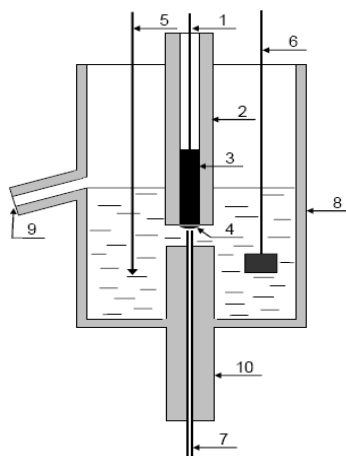
Elektrochemické stanovení v průtokovém systému: FIA a HPLC s autosamplerem: Měření technikou FIA a HPLC byla prováděna na kapalinovém chromatografu ve složení: Gradientová pumpa L-7100, autosampler L-7200, spektrofotometrický detektor L-7400 (vše Merck-Hitachi, Německo), řídící jednotka D-7000 (Merck-Hitachi, USA). HPLC byla uskutečněna na koloně LiChrospher 100 RP-18 endcapped ($125 \times 4 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$, Merck, Německo) s použitím předkolony LiChrospher PAH (Merck). Obsluhu systému, sběr dat a vyhodnocení dat zajišťoval osobní počítač s programem HSM (Merck-Hitachi, Německo), pracující v operačním systému MS Windows NT. Měření byla prováděna za laboratorní teploty, kolona nebyla termostatována.

FIA s ručním dávkováním: Měření technikou FIA byla dále prováděna na kapalinovém chromatografu ve složení: Vysokotlaká gradientová pumpa L-2130, dávkovací ventil s $20 \mu\text{l}$ smyčkou (vše Hitachi, Japonsko). Jako ovládací software byl

použit EZChrom Elite (Agilent Technologies, USA), pracující v operačním systému Windows XP (Microsoft Corporation).

Ampérometrický detektor byl realizovaný jako elektrochemický „wall-jet“ detektor (viz Obr. 2.2) tvořený přepadovou nádobkou naplněnou nosným roztokem, s pracovní elektrodou pevně fixovanou proti ústí výtokové teflonové trubičky z aparatury. Jednotlivá měření byla prováděna stejně jako u voltametrie v tříelektrodovém zapojení. Při měření metodou FIA s autosamplerm a ručním dávkováním byla jako pracovní elektroda použita velkoplošná m-AgSAE. Při měření metodou HPLC byla použita velkoplošná AgSAE v modifikaci m-AgSAE, p-AgSAE nebo MF-AgSAE a dále klasická m-AgSAE s menším povrchem. Jako referentní elektroda byla použita argentchloridová elektroda ($3 \text{ mol l}^{-1} \text{ KCl}$) a jako pomocná elektroda byla použita platinová elektroda (Monokrystaly, Turnov).

Spektrofotometrický detektor byl stabilně nastaven na 230 nm. Byl použit potenciostat ADLC 1 (Laboratorní přístroje, ČR). Používané mobilní fáze byly odvzdušňovány ultrazvukem PS 02000 A (Powersonic) a kontinuálním probubláváním dusíkem čistoty 4.0 (Linde, Praha).



Obr. 2.2

„Wall-jet“ detektor se stříbrnou tuhou amalgamovou elektrodou: m-AgSAE (1 – 4), elektrický kontakt (1), skleněná trubička (2), Ag amalgam (3), Hg meniskus (4), referentní elektroda (5), pomocná Pt elektroda (6), teflonová trubička – výstup ze systému (7), skleněná přepadová nádobka (8), přepad (9), skleněná kapilára umožňující fixaci přívodní teflonové kapiláry z průtokového systému (10).

2.3 Pracovní elektrody

2.3.1 Stříbrné tuhé amalgamové elektrody

Při voltametrických stanoveních byla používána klasická m-AgSAE č. 2-05-18 (průměr amalgamového disku 0,52 mm, což odpovídá ploše 0,21 mm²) vyrobená firmou EcoTrend-Plus, Praha. V rámci měření byly prováděny s elektrodou operace amalgamace, elektrochemická aktivace a regenerace popsané níže.

Při měření metodou FIA s autosamplerem a ručním dávkováním byla používána velkoplošná AgSAE v modifikaci m-AgSAE (průměr amalgamového disku 2,47 mm, což odpovídá ploše 4,79 mm²). V rámci měření byly prováděny s elektrodou operace amalgamace a elektrochemická aktivace.

Při měření metodou HPLC byla používána klasická m-AgSAE jako pro voltametrii a dále velkoplošná AgSAE (průměr amalgamového disku 2,47 mm). Tato elektroda byla po úpravě povrchu použita buď jako m-AgSAE, p-AgSAE nebo MF-AgSAE.

Leštění p-AgSAE bylo prováděno pomocí vlhké aluminy o velikosti částic 1,1 μm po dobu 1 – 3 min a následně provedena elektrochemická aktivace.

MF-AgSAE byla připravena elektrochemickou cestou z roztoku obsahujícího 0,01 mol l⁻¹ chlorid rtuťnatý a 1 mol l⁻¹ chlorid draselný při potenciálu -0,2 V po dobu 45 minut. Po vytvoření rtuťového filmu o tloušťce 5,4 μm byla provedena elektrochemická aktivace.

Amalgamace: Ponořením klasické m-AgSAE do kapalné rtuti asi na 15 s se obnovil celý meniskus. Amalgamace byla prováděna vždy asi po jednom týdnu, anebo po dlouhodobém přerušení práce. Velkoplošná m-AgSAE pro FIA a pro HPLC byla připravena přímo nanesením kapalné rtuti na vyleštěný povrch AgSAE pomocí Hamiltonovy injekční stříkačky.

Elektrochemická aktivace: Aktivace byla prováděna v roztoku 0,2 mol l⁻¹ KCl, který nebyl probubláván dusíkem, vložením napětí -2 200 mV po dobu 300 s. Aktivace byla prováděna po amalgamací, leštění, vytvoření rtuťového filmu a při přerušení práce na dobu delší než jednu hodinu.

Regenerace klasické m-AgSAE při voltametrických měřeních: Skokové střídání kladnějšího konstantního potenciálu E_{in} a zápornějšího konstantního potenciálu E_{fin} v intervalech 0,1 s po dobu 15 s. Potenciálový program končil vždy při zápornějším potenciálu. Hodnoty potenciálů E_{in} a E_{fin} jsou pro jednotlivá pH uvedeny v Tab. 2.1.

Tab. 2.1

Používané hodnoty regeneračních potenciálů E_{in} a E_{fin} v prostředí BR pufru pro jednotlivá pH.

pH	$-E_{in}$ [mV]	$-E_{fin}$ [mV]
2,0	150	1050
3,0	100	1350
4,0	150	1350
5,0	100	1330
6,0	200	1350
7,0	200	1550
8,0	200	1550
9,0	250	1620
10,0	300	1650
11,0	330	1620
12,0	350	1700

2.3.2 Visící rtuťová kapková elektroda

Pro voltametrické stanovení byla používána visící rtuťová kapková elektroda typ UM μ E, výrobní číslo 00406 (EcoTrend-Plus, Praha) o experimentálně zjištěném povrchu kapky $1,36 \cdot 10^{-2} \text{ cm}^2$. Povrch kapky byl určen z hmotnosti 20 kapek rtuti v prostředí $0,1 \text{ mol l}^{-1} \text{ KCl}$ při nulovém vloženém napětí proti používané referenční argentchloridové elektrodě. Základní elektrolyt byl slit a rtuť několikrát opláchnuta methanolem a osušena proudem vzduchu do konstantní hmotnosti. Pro výpočet byl

předpokládán kulový charakter rtuti⁴⁵. Velikost kapky byla dána otevřením ventilku po dobu 100 ms.

2.4 Pracovní postupy

2.4.1 Voltametrická analýza léčiva

Při analýze léčiva metodou DP a DC voltametrie na HMDE bylo postupováno následujícím způsobem: Prášek dodaný výrobcem (48,1 mg) byl rozpuštěn v 18,5 ml ethanolu. Z tohoto roztoku byl odebrán 1 ml roztoku a zředěn na 10 ml ethanolu. Z něj bylo do 10 ml odměrné baňky odebráno 100 μ l a doplněno BR pufrům o pH 2,2. Koncentrace Carmustinu v takto připraveném roztoku byla $1,2 \cdot 10^{-5}$ mol l^{-1} při teoreticky 100% obsahu Carmustinu v prášku.

Takto připravený roztok byl po promíchání převeden do polarografické nádoby a zbaven kyslíku pětiminutovým probubláváním dusíkem. Před vstupem dusíku do nádoby byla zařazena promývačka obsahující deionizovanou vodu. Poté byl proveden záznam voltametrické křivky. Následně byl k roztoku přidán standardní přírůstek 12 μ l Carmustinu v ethanolu ($c = 1 \cdot 10^{-2}$ mol l^{-1}) a proveden záznam voltametrické křivky. Byly provedeny dva standardní přírůstky. Koncentrace přidaného Carmustinu byla $1,2 \cdot 10^{-5}$ mol l^{-1} po prvním a $2,4 \cdot 10^{-5}$ mol l^{-1} po druhém přírůstku. Všechny křivky byly měřeny třikrát. Všechna měření byla prováděna za laboratorní teploty.

2.4.2 Analýza léčiva dle lékopisu

Při spektrofotometrické analýze léčiva byl postup uvedený v lékopisu¹ modifikován následujícím způsobem: Asi 10,9 mg prášku dodaného výrobcem bylo přesně odváženo a rozpuštěno v 3,3 ml ethanolu a zředěno deionizovanou vodou na 10,9 ml. Z tohoto roztoku byly odebrány 3 ml roztoku a zředěny na 100 ml deionizovanou vodou.

Byla provedena čtyři paralelní stanovení. U takto připravených roztoků byla měřena absorpance v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1 mm při vlnové délce

maxima $\lambda_{max} = 230$ nm. Referentní kyveta byla naplněna směsí ethanol:deionizovaná voda (3:97, v/v).

Obsah Carmustinu v prášku byl poté vypočten za použití specifické absorbance, která má hodnotu 270. Specifická absorbance vyjadřuje absorbanci roztoku látky o koncentraci 10 g l^{-1} měřenou v 1 mm vrstvě při určité vlnové délce dle vztahu:

$$A_{1mm}^{1\%} = 10\varepsilon / M_r,$$

kde $A_{1mm}^{1\%}$ (značící se α) je specifická absorbance, ε je molární absorpční koeficient a M_r relativní molekulová hmotnost. Z tohoto vztahu lze vyjádřit hmotnostní koncentraci c_m roztoku v kyvetě:

$$c_m = 10A / \alpha \cdot l,$$

kde A je měřená absorbance, α je specifická absorbance a l tloušťka vrstvy v milimetrech. Hmotnostní koncentrace byla následně přepočítána na hmotnost Carmustinu ve stanovovaném vzorku léčiva.

2.4.3 Průtoková injekční analýza

Pro oba FIA systémy s autosamplerem i ručním dávkovacím ventilem byl jako nosný elektrolyt použit BR pufr o daném pH, který byl před měřením 15 minut odvzdušňován ultrazvukem a dále probubláván 10 minut dusíkem. Před vstupem dusíku do nádoby byla zařazena promývačka obsahující deionizovanou vodu. Prostor elektrochemického detektoru byl před analýzou probubláván 5 minut dusíkem, během analýzy bylo bubláno nad roztok. Dále byl kontinuálně probubláván nosný roztok a vzorky před nadávkováním dusíkem, pokud není uvedeno jinak. Po každém dni měření byly oba FIA systémy minimálně po dobu 15 minut promývány deionizovanou vodou.

Všechny křivky byly měřeny nejméně třikrát. Všechna měření byla prováděna za laboratorní teploty.

2.4.4 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Mobilní fáze byla připravena smísením příslušného objemu vodné složky a methanolu. Vodná složka obsahovala BR pufr o daném pH nebo fosfátový pufr o koncentraci $c = 0,01 \text{ mol l}^{-1}$ a $c = 0,04 \text{ mol l}^{-1}$. pH mobilních fází bylo upravováno

změnou pH vodné složky, takže údaje týkající se pH mobilní fáze udávají pH vodné složky fáze. Používaná mobilní fáze byla před měřením 15 minut odvzdušňována ultrazvukem a dále probublávána 10 minut dusíkem. Před vstupem dusíku do nádoby byla zařazena promývačka obsahující směs methanolu a deionizované vody v poměru 40:60 (v/v). Prostor elektrochemického detektoru byl před analýzou probubláván 5 minut dusíkem, během analýzy bylo bubláno nad roztok. Dále byl kontinuálně probubláván nosný roztok a vzorky před nadávkováním dusíkem, pokud není uvedeno jinak. Dávkování analytu zajišťoval automatický dávkovač, který byl před každým dnem měření propláchnut směsí methanolu a deionizované vody v poměru 40:60 (v/v). Po každém dni měření byl dle doporučení dodavatele kolony celý systém minimálně po dobu 15 minut promýván směsí methanolu a deionizované vody v poměru 40:60 (v/v).

Při spektrofotometrické detekci byl Carmustin detegován při vlnové délce absorpčního maxima $\lambda_{max} = 230$ nm. Při této vlnové délce byly také proměřeny kalibrační závislosti.

Všechny křivky byly měřeny nejméně třikrát. Všechna měření byla prováděna za laboratorní teploty. Statistické zpracování dat je vždy uváděno na hladině významnosti $\alpha = 0,05$.

Mez stanovitelnosti (L_Q) a mez detekce (L_D)⁴⁶ byly u všech měření spočteny jako koncentrace látky, jejíž proudové odezvy mají hodnotu desetinásobku a trojnásobku směrodatné odchylky s stanovení při nejnižší dosažené koncentraci dle vztahů:

$$L_Q = 10s/b \text{ a } L_D = 3s/b,$$

kde b je směrnice kalibrační závislosti.

2.4.5 Chemická destrukce Carmustinu manganistanem draselným

V práci byly testovány dvě metody: Chemická destrukce Carmustinu přímo oxidací manganistanem draselným a chemická destrukce Carmustinu po redukci práškovým zinkem s následnou oxidací manganistanem draselným.

Při chemické destrukci Carmustinu přímou oxidací manganistanem draselným bylo postupováno následujícím způsobem: Nejprve byl připraven zásobní roztok Carmustinu v koncentrované kyselině octové o koncentraci $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$. Z připraveného roztoku bylo do 100 ml kádinky odpipetováno 10 ml roztoku, přidáno

10 ml 2 mol l^{-1} kyseliny sírové, 10 ml $0,2 \text{ mol l}^{-1}$ manganistanu draselného a roztok byl míchán pod laboratorním sklem na magnetické míchače. Po hodinových intervalech byl odebrán vždy 1 ml vzorku, k němu přidán 1 ml 1 mol l^{-1} kyseliny šťavelové k odstranění nezreagovaného manganistanu draselného. Z takto připraveného roztoku byl odebrán 1 ml a analyzován metodou DPV s klasickou m-AgSAE a HPLC-ED s velkoplošnou m-AgSAE. V případě HPLC-ED byl roztok přímo dávkován do systému. Při měření technikou DPV bylo postupováno dvojím způsobem. Nejprve byl zanalyzován vzorek připravený způsobem popsaným výše a v druhém případě bylo k vzorku přidáno pár kapek 10 mol l^{-1} roztoku hydroxidu sodného a pH upraveno na hodnotu 7,0 (pH bylo kontrolováno pH papírkem).

Poté byl k destruovanému roztoku přidán standardní přídavek Carmustinu v koncentrované kyselině octové ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) a proveden záznam voltametrické a chromatografické křivky. Byly provedeny čtyři standardní přídávky. Všechny křivky byly měřeny třikrát. Všechna měření byla prováděna za laboratorní teploty.

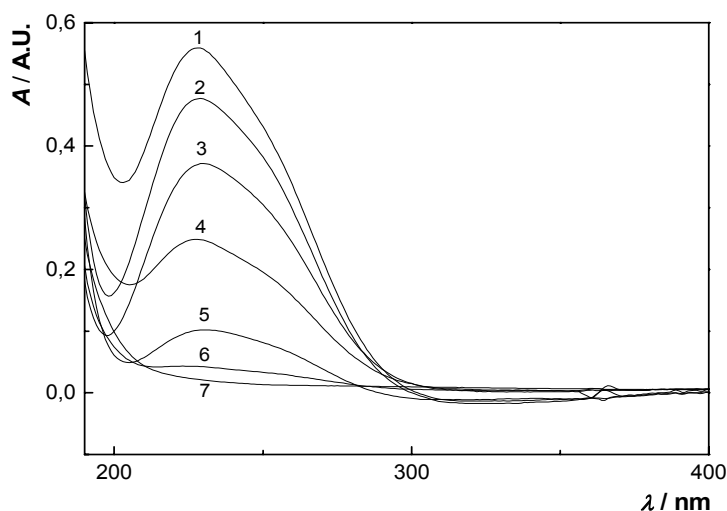
Pro urychlení destrukce bylo v druhém případě k destruovanému roztoku Carmustinu přidán práškový zinek pro jeho redukci před oxidací manganistanem draselným a bylo postupováno následujícím způsobem: Do 100 ml kádinky obsahující 10 ml roztoku Carmustinu v koncentrované kyselině octové a 10 ml 2 mol l^{-1} kyseliny sírové bylo přidáno 165 mg práškového zinku. Roztok byl míchán pod laboratorním sklem na magnetické míchače po dobu 10 minut, po uplynutí této doby bylo do roztoku přidáno 10 ml $0,2 \text{ mol l}^{-1}$ manganistanu draselného a směs dále míchána. Po půl hodinových intervalech byl odebrán vždy 1 ml vzorku, k němu přidán 1 ml 1 mol l^{-1} kyseliny šťavelové k odstranění nezreagovaného manganistanu draselného. Z takto připraveného roztoku byl odebrán 1 ml a opět analyzován metodou DPV a HPLC-ED. V případě HPLC-ED byl roztok přímo dávkován do systému. Při měření technikou DPV bylo opět postupováno dvojím způsobem, viz výše.

2.5 Stálost zásobního roztoku Carmustinu

2.5.1 Stálost zásobního roztoku Carmustinu ve vodě

Stálost zásobního roztoku Carmustinu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ v deionizované vodě byla sledována spektrofotometricky v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1 mm. Referentní kyveta byla naplněna deionizovanou vodou. Absorbance zásobního roztoku byla měřena při vlnové délce $\lambda_{\text{max}} = 230 \text{ nm}$, při které studovaná látka vykazovala absorpční maximum. Hodnota molárního absorpčního koeficientu (ϵ) při této vlnové délce činila $5,588 \cdot 10^3 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Absorpční spektra studované látky v průběhu měření stálosti zásobního roztoku jsou uvedena na Obr. 2.3. Výsledky měření stálosti zásobního roztoku jsou shrnuty v Tab. 2.2.



Obr. 2.3

Absorpční spektrum roztoku Carmustinu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) v deionizované vodě. Měřeno proti deionizované vodě v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1 mm; 1.den (1), 2.den (2), 5.den (3), 10.den (4), 15.den (5), 22.den (6), 44.den (7).

Tab. 2.2

Spektrofotometrické studium stálosti zásobního roztoku Carmustinu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ v deionizované vodě. Číselné hodnoty udávají relativní hodnotu absorbance v % proti hodnotě absorbance čerstvě připraveného roztoku ($\lambda_{\text{max}} = 230 \text{ nm}$). Měřeno proti deionizované vodě v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1 mm.

Dny	A_{230} [AU]	[%]		Dny	A_{230} [AU]	[%]
1	0,559	100,0		11	0,159	28,5
2	0,477	85,3		12	0,177	31,7
3	0,439	78,5		15	0,101	18,1
5	0,370	66,2		17	0,088	15,7
8	0,311	55,6		22	0,043	7,7
9	0,237	42,4		29	0,021	3,8
10	0,249	44,5		44	0,022	3,9

Z naměřených hodnot absorbance v Tab. 2.2 vyplývá, že Carmustin je ve vodě nestálý, celkový pokles absorbance v průběhu 44 dnů činil cca 96 %. Nestálost Carmustinu ve vodných prostředích byla sledována již dříve^{21,22}. Dle těchto studií se Carmustin za laboratorní teploty rozkládá za vzniku acetaldehydu a 2-chlorethylaminu, dusíku a oxidu uhličitého, nejstabilněji se jeví roztoky při pH 5,2 – 5,5. Vzhledem k tomu, že pH samotného zásobního roztoku Carmustinu bylo 5,3, nebylo jeho pH ke zvýšení stability nijak upravováno.

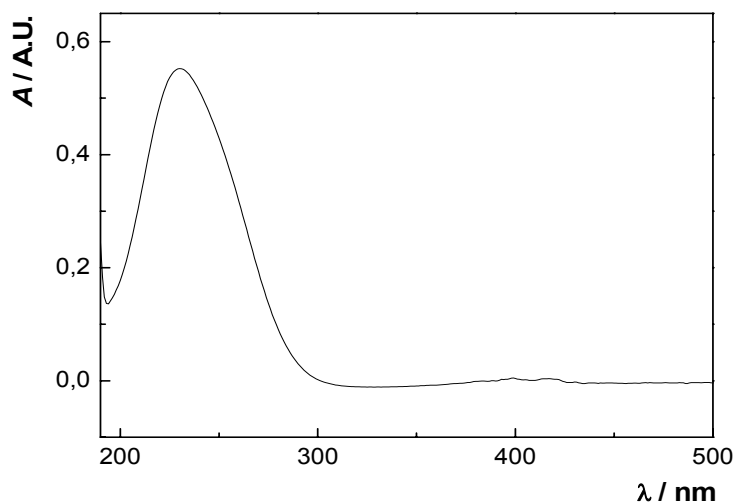
Zásobní roztok Carmustinu v deionizované vodě byl používán pro voltametrická měření a při měření metodou FIA s autosamplrem.

V důsledku jeho nestálosti byla tato měření prováděna v sériích trvajících maximálně tři dny. Před proměřením každé série byl připravován vždy nový zásobní roztok Carmustinu.

2.5.2 Stálost zásobního roztoku Carmustinu v ethanolu

Stálost zásobního roztoku Carmustinu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ v ethanolu byla sledována spektrofotometricky v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1 mm. Referentní kyveta byla naplněna ethanolom. Absorbance zásobního roztoku byla měřena při vlnové délce $\lambda_{max} = 230 \text{ nm}$, při které studovaná látka vykazovala absorpční maximum. Hodnota molárního absorpčního koeficientu (ε) při této vlnové délce činila $5,523 \cdot 10^3 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Absorpční spektrum studované látky je uvedeno na Obr. 2.4. Výsledky měření stálosti zásobního roztoku jsou shrnuty v Tab. 2.3.



Obr. 2.4

Absorpční spektrum roztoku Carmustinu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) v ethanolu. Měřeno proti ethanolu v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1 mm.

Tab. 2.3

Spektrofotometrické studium stálosti zásobního roztoku Carmustinu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ v ethanolu. Číselné hodnoty udávají relativní hodnotu absorpance v % proti hodnotě absorpance čerstvě připraveného roztoku ($\lambda_{\text{max}} = 230 \text{ nm}$). Měřeno proti ethanolu v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1 mm.

Dny	A_{230} [AU]	[%]
1	0,552	100,0
2	0,570	103,3
6	0,564	102,2
8	0,544	98,6
30	0,549	99,5

Z naměřených hodnot absorpance v Tab. 2.3 vyplývá, že v zásobním roztoku Carmustinu v ethanolu, uchovávaném za nepřístupu světla v chladničce, nedošlo v průběhu 30 dní k poklesu koncentrace studované látky. Zásobní roztok byl za těchto podmínek uchovávání stálý.

Zásobní roztok Carmustinu v ethanolu byl používán při měření metodou HPLC a FIA s ručním dávkováním.

3. Voltametrické stanovení Carmustinu

V této kapitole byly vyvinuty voltametrické metody (DPV a DCV) pro stanovení Carmustinu na klasické m-AgSAE a HMDE⁴⁷.

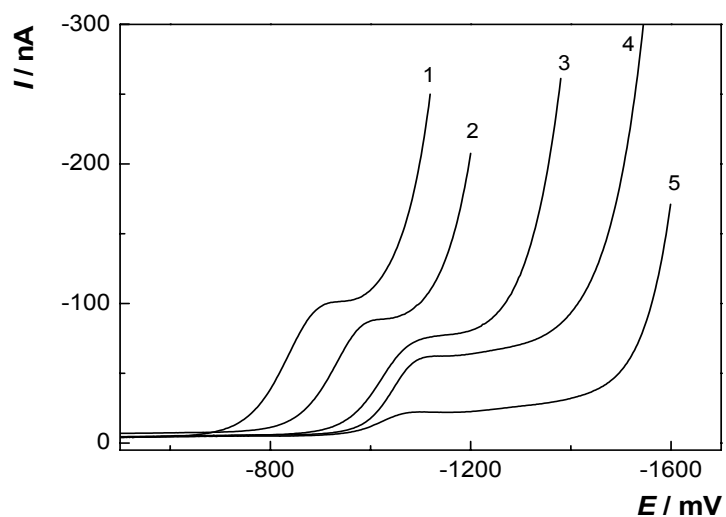
Při voltametrických měřeních bylo zjištěno, že se elektrochemické chování Carmustinu na obou elektrodách liší: Na m-AgSAE byla pozorovatelná pouze 1 vlna v celém studovaném rozsahu pH BR pufru (2,0 – 12,0) jak je vidět na Obr. 3.1, na HMDE látka poskytovala v prostředí BR pufru 1 až 2 píky či vlny (viz Obr. 3.2), jejichž poloha a výška závisela na pH použitého BR pufru. Zároveň byl pozorován velký rozdíl potenciálů pro redukci Carmustinu na m-AgSAE a HMDE, který pro prostředí BR pufru o pH 2,0 – 7,0 činil cca 400 mV a pozitivnější potenciál příslušel vždy HMDE.

Pro měření na m-AgSAE bylo jako optimální zvoleno prostředí BR pufru o pH 7,0, kdy látka poskytovala opakovatelné a vzhledem k maximálnímu rozdílu potenciálu redukce Carmustinu a úniku základního elektrolytu i snadno vyhodnotitelné vlny. Pro měření na HMDE bylo jako optimální zvoleno prostředí BR pufru o pH 2,2, jelikož v tomto prostředí nebyly voltamogramy komplikovány následnými vlnami. Navíc vzhledem ke zmiňovanému posunu redukce Carmustinu k pozitivnějším potenciálům také nedocházelo k interferenci signálu s únikem základního elektrolytu jako v případě m-AgSAE.

V Tab. 3.1 jsou shrnuty podmínky stanovení a meze stanovitelnosti, v Tab. 3.2 pak statistické vyhodnocení opakovatelnosti měření pro stanovení Carmustinu na klasické m-AgSAE a HMDE.

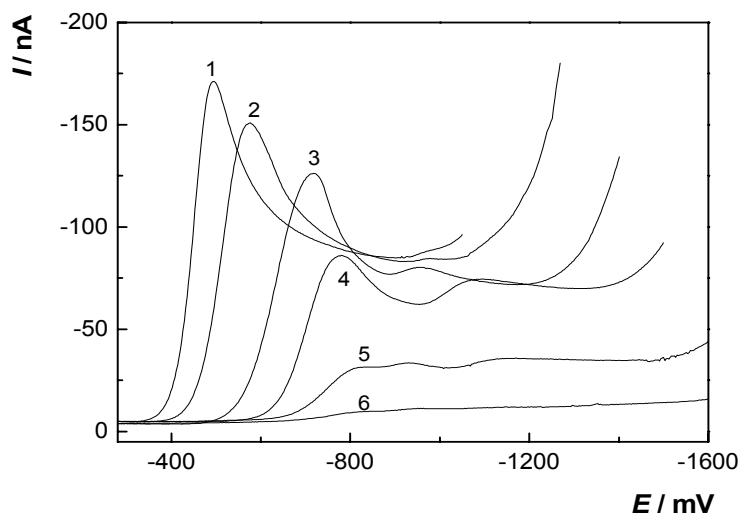
Při stanovení Carmustinu na klasické m-AgSAE byla dosažena meze stanovitelnosti $8,3 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ při DC voltametii a $7,1 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ při DPV, na HMDE bylo dosaženo nižších hodnot, a to $3,6 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ při DC voltametii a $6,2 \cdot 10^{-7} \text{ mol l}^{-1}$ při DPV.

Z Tab. 3.2 je zřejmé, že na obou elektrodách bylo dosaženo relativní směrodatné odchylky do 3,3 % pro nižší koncentrace, což svědčí o možném použití těchto elektrod v praktických aplikacích.



Obr. 3.1

Voltamogramy Carmustinu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) měřené technikou DCV na klasické m-AgSAE v prostředí BR pufru o výsledném pH 2,2 (1); 3,0 (2); 5,0 (3); 7,0 (4); 9,0 (5).



Obr. 4.2

Voltamogramy Carmustinu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) měřené technikou DCV na HMDE v prostředí BR pufru o výsledném pH 2,2 (1); 3,0 (2); 5,0 (3); 7,0 (4); 9,0 (5); 10,0 (6).

Tab. 3.1

Optimální prostředí, potenciál píku E_p či maxima vlny E_v a mez stanovitelnosti L_Q pro voltametrické stanovení Carmustinu na klasické m-AgSAE a HMDE.

	klasická m-AgSAE		HMDE	
	DCV	DPV	DCV	DPV
prostředí	BR pufr pH 7,0	BR pufr pH 7,0	BR pufr pH 2,2	BR pufr pH 2,2
$-E_p, -E_v$ [mV]	1098	1043	493	446
L_Q [mol l ⁻¹]	$8,3 \cdot 10^{-7}$	$7,1 \cdot 10^{-7}$	$3,6 \cdot 10^{-7}$	$6,2 \cdot 10^{-7}$

Tab. 3.2

Statistické vyhodnocení opakovatelnosti výšky píku Carmustinu z deseti stanovení. Prostředí viz Tab. 3.1.

	klasická m-AgSAE			HMDE		
metoda	c [mol l ⁻¹]	s [nA]	s_r [%]	c [mol l ⁻¹]	s [nA]	s_r [%]
DCV	$1 \cdot 10^{-4}$	0,57	2,29	$1 \cdot 10^{-4}$	0,72	0,49
DPV	$1 \cdot 10^{-4}$	0,24	1,49	$1 \cdot 10^{-4}$	1,17	0,62
DCV	$4 \cdot 10^{-6}$	0,03	1,94	$6 \cdot 10^{-7}$	0,04	3,30
DPV	$4 \cdot 10^{-6}$	0,02	1,37	$6 \cdot 10^{-7}$	0,07	1,88

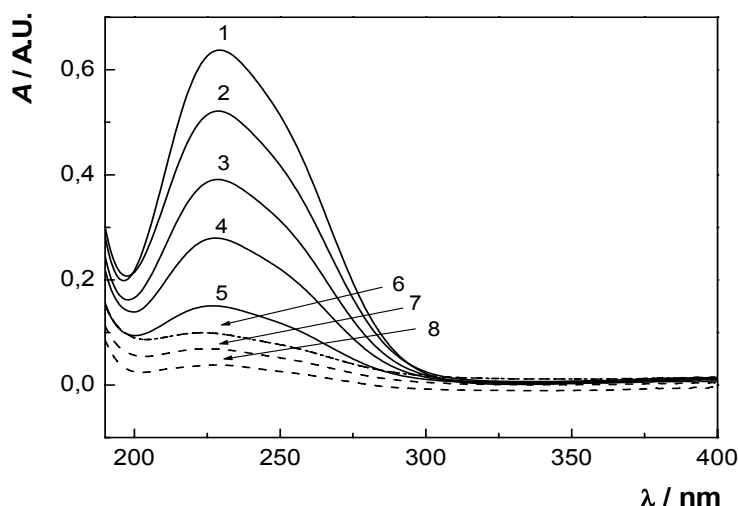
4. Spektrofotometrické stanovení Carmustinu

Spektrofotometricky byla stanovena absorbance roztoku Carmustinu v deionizované vodě v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1 cm při vlnové délce maxima $\lambda_{max} = 230 \text{ nm}$ v koncentračním rozmezí $6 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Referentní kyveta byla naplněna deionizovanou vodou. Při koncentraci nižší než $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ již nebyl zaznamenán pozorovatelný absorpční pás.

Naměřená absorpční spektra Carmustinu v uvedeném rozmezí jsou uvedena na Obr. 4.1. Změnu absorbance s koncentrací Carmustinu lze popsat rovnicí:

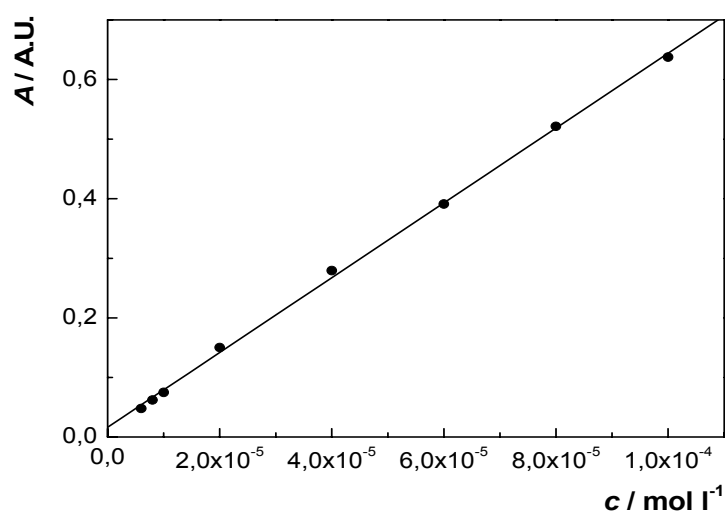
$$A = 6,28 \cdot 10^3 c + 0,02 \quad (\text{korelační koeficient: } 0,9995)$$

Získaná kalibrační závislost je znázorněna na Obr. 4.2.



Obr. 4.1.

Absorpční spektra roztoku Carmustinu v deionizované vodě v koncentračním rozmezí $6 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Měřeno proti deionizované vodě v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1 cm. c (Carmustinu): $1 \cdot 10^{-4}$ (1), $8 \cdot 10^{-5}$ (2), $6 \cdot 10^{-5}$ (3), $4 \cdot 10^{-5}$ (4), $2 \cdot 10^{-5}$ (5), $1 \cdot 10^{-5}$ (6), $8 \cdot 10^{-6}$ (7), $6 \cdot 10^{-6}$ (8) mol l^{-1} .



Obr. 4.2

Závislost absorbance roztoku Carmustinu v deionizované vodě na koncentraci Carmustinu v rozmezí $6 \cdot 10^{-6}$ – $1 \cdot 10^{-4}$ mol l⁻¹. Měřeno při vlnové délce maxima $\lambda_{\max} = 230$ nm proti deionizované vodě v křemenných kyvetách o měrné tloušťce 1 cm.

Z naměřených dat vyplývá, že Carmustin v deionizované vodě není možné spektrofotometricky stanovit při koncentracích nižších než $6 \cdot 10^{-6}$ mol l⁻¹. Metoda má tedy o řád vyšší mez stanovitelnosti než techniky DCV a DPV na m-AgSAE a HMDE.

5. Analýza Carmustinu v lékové formě

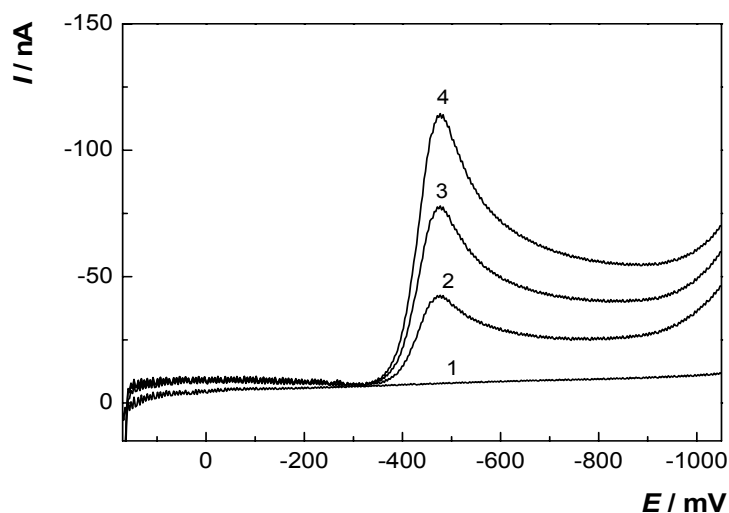
5.1 Stanovení metodou DPV a DCV na HMDE

Optimalizovaný postup stanovení Carmustinu metodou DCV a DPV popsaný v předchozí kapitole byl modifikován pro stanovení Carmustinu v prášku BiCNU Carmustinum®, obsahujícího dle výrobce 100 mg Carmustinu, tj. 100 % obsahu prášku. Pro analýzu bylo použito poloviční množství a navržena metoda dvou standardních přídavek popsaná v podkapitole 2.4.

Pro DC voltametrii jsou zaznamenané voltametrické křivky znázorněny na Obr. 5.1. a pro DPV na Obr. 5.3. Grafické vyhodnocení pro metodu dvou standardních přídavek je na Obr. 5.2 pro DCV a na Obr. 5.4 pro DPV. Parametry proložených přímek jsou uvedeny v Tab. 5.1.

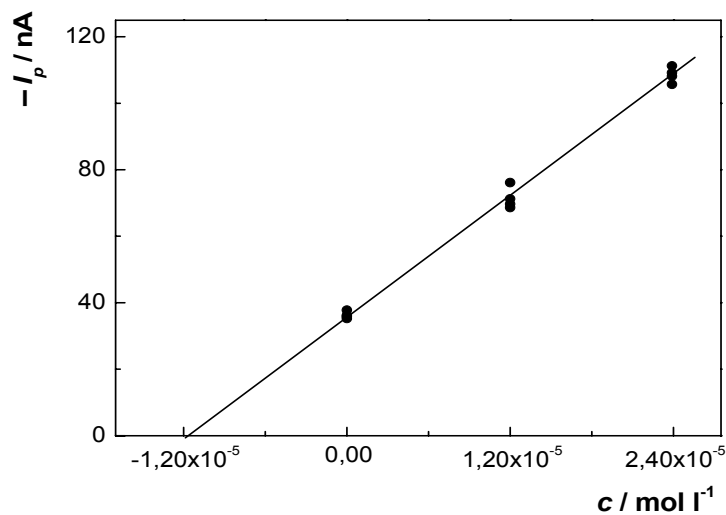
Grafickou metodou byla určena koncentrace Carmustinu ve vzorku v polarografické nádobce a přepočtena na obsah Carmustinu v prášku léčiva. Výsledky stanovení pro obě voltametrické metody jsou shrnuty v Tab. 5.2.

Z naměřených dat vyplývá, že pro aplikaci voltametrického stanovení na léčivo je vhodná technika DPV i DCV s hodnotami odchylek od deklarované hodnotami 0,85 % pro DPV a 1,17 % pro DCV.



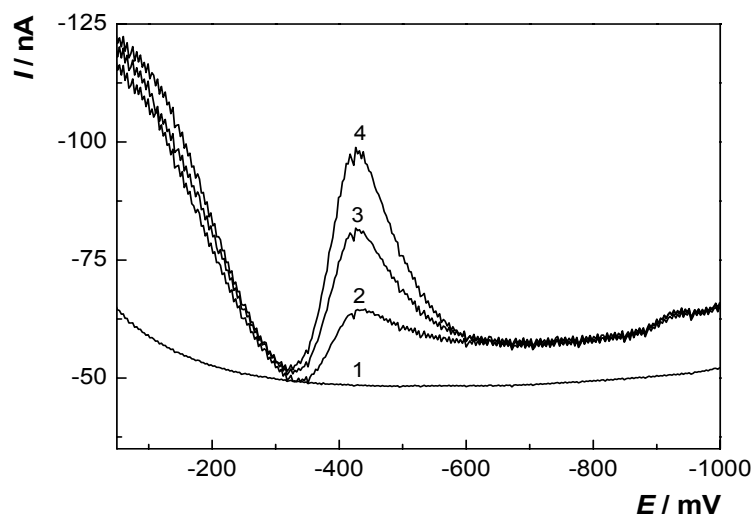
Obr. 5.1.

Voltamogramy při stanovení obsahu Carmustinu v prášku BiCNU Carmustinum® měřené technikou DCV na HMDE v prostředí BR pufru o pH 2,2. Základní elektrolyt (1), roztok připravený ze vzorku prášku bez standardního přídavku (2), roztok připravený ze vzorku prášku s prvním standardním přídavkem (3), roztok připravený ze vzorku prášku se dvěma standardními přídavky (4).



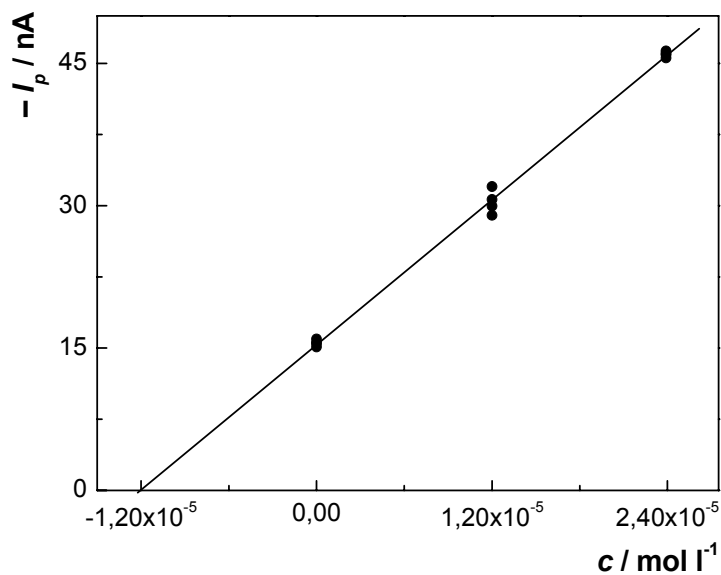
Obr. 5.2

Grafické vyhodnocení metody dvou standardních přídavků při stanovení obsahu Carmustinu v prášku BiCNU Carmustinum® technikou DCV na HMDE v prostředí BR pufru o pH 2,2.



Obr. 5.3.

Voltamogramy při stanovení obsahu Carmustinu v prášku BiCNU Carmustinum® měřené technikou DPV na HMDE v prostředí BR pufru o pH 2,2. Základní elektrolyt (1), roztok připravený ze vzorku prášku bez standardního přídavku (2), roztok připravený ze vzorku prášku s prvním standardním přídavkem (3), roztok připravený ze vzorku prášku se dvěma standardními přídavky (4).



Obr. 5.4

Grafické vyhodnocení metody dvou standardních přídavků při stanovení obsahu Carmustinu v prášku BiCNU Carmustinum® technikou DPV na HMDE v prostředí BR pufru o pH 2,2.

Tab. 5.1.

Parametry závislosti výšky píku na koncentraci Carmustinu pro metodu dvou standardních přídavek a techniku DCV a DPV na HMDE v prostředí BR pufru o pH 2,2.

metoda	směrnice [nA mol ⁻¹ l]	úsek [nA]	korelační koeficient
DCV	3,03·10 ⁶	35,9	0,9973
DPV	1,27·10 ⁶	15,4	0,9984

Tab. 5.2.

Výsledky stanovení obsahu Carmustinu v prášku BiCNU Carmustinum® metodami DCV a DPV na HMDE v prostředí BR pufru o pH 2,2.

	DCV	DPV
dáno ($m_{\text{navážky}} (m_{\text{teor}})$) [mg]	46,23	
nalezeno ($m_{\text{prakt.}}$) [mg]	45,69 ± 1,04	46,62 ± 0,85
obsah Carmustinu v prášku [%]	98,83 ± 2,25	100,80 ± 1,84
odchylka od deklarované hodnoty [%]	1,17	0,80

- $m_{\text{navážky}}$ – hmotnost navážky prášku použitého k analýze odpovídá hmotnosti Carmustinu m_{teor} při udávaném 100% obsahu Carmustinu v prášku
- $m_{\text{prakt.}}$ – hmotnost Carmustinu určená navrženou voltametrickou metodou

5.2 Stanovení dle lékopisu

Stanovení obsahu Carmustinu v prášku BiCNU Carmustinum® bylo provedeno spektrofotometricky při vlnové délce maxima $\lambda_{max} = 230 \text{ nm}$ dle lékopisu¹. Pro analýzu bylo použito postupu uvedeného v podkapitole 2.4.2.

V Tab. 5.3 jsou shrnuty naměřené a vypočtené hodnoty stanovení, v Tab. 5.4 pak statistické vyhodnocení obsahu Carmustinu v prášku.

Z naměřených dat je zřejmé, že spektrofotometrické stanovení obsahu Carmustinu v lékové formě je přesné s relativní směrodatnou odchylkou 0,3 %.

Z výsledků stanovení obsahu Carmustinu v lékové formě vyplývá, že vhodnou metodou stanovení je jednak voltametrické, jednak spektrofotometrické stanovení.

Tab. 5.3

Naměřené a vypočtené hodnoty stanovení obsahu Carmustinu v prášku dle lékopisu (stanovení bylo prováděno ve čtyřech paralelních vzorcích).

číslo měření	$m_{navážky} (m_{teor})$ [mg]	absorbance [A.U.]	$m_{prakt.}$ [mg]	obsah Carmustinu [%]
1	10,97	0,821	11,05	100,7
2	10,94	0,814	10,95	100,1
3	10,95	0,817	10,99	100,4
4	10,93	0,813	10,94	100,1

$m_{navážky}$ – hmotnost navážky prášku použitého k analýze odpovídá hmotnosti Carmustinu m_{teor} při udávaném 100% obsahu Carmustinu v prášku

$m_{prakt.}$ – dokázaná hmotnost Carmustinu

Tab. 5.4

Statistické vyhodnocení obsahu Carmustinu v prášku (vyhodnoceno ze čtyř paralelních měření).

	medián [%]	s [%]	s_r [%]	$L_{1/2}$ [%]
Spektrofotometrie	100,3	0,3	0,3	0,4

6. Stanovení Carmustinu průtokovou injekční analýzou

6.1 Stanovení Carmustinu při dávkování automatickým dávkovačem

Pro stanovení Carmustinu v průtoku s elektrochemickou detekcí bylo používáno prostředí optimalizované při voltametrických studiích, tj. jako nosný elektrolyt byl použit BR pufr o pH 7,0. Jako pracovní elektroda byla použita velkoplošná m-AgSAE, která zpravidla vykazuje vyšší citlivost při stanovení organických látek než p-AgSAE a MF-AgSAE³⁴.

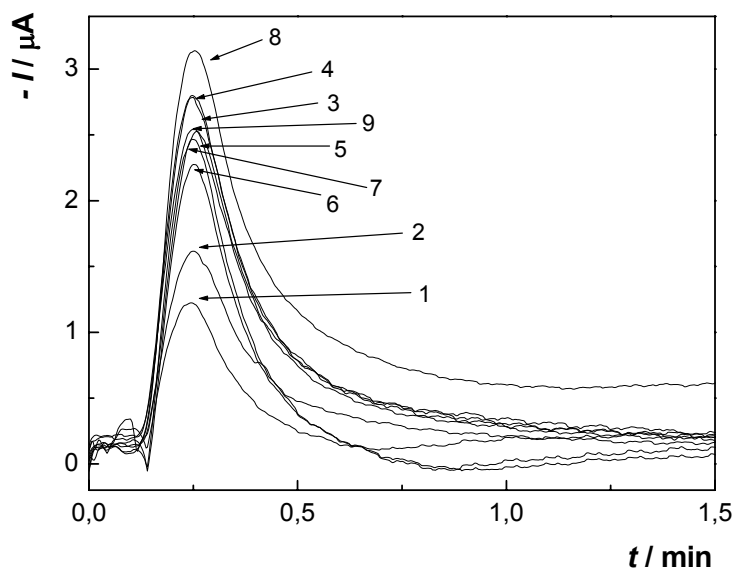
Nejprve byl testován FIA systém s autosamplerm pro dávkování vzorků. Při měření bylo zjištěno, že Carmustin vykazuje pro týž vložené potenciály detekce odlišné hodnoty odezev. Odezvy elektrochemického detektoru na Carmustin pro devět měření při potenciálu detekce $E_{det} = -0,8$ V ukazuje Obr. 6.1. Naměřená data byla statisticky vyhodnocena. Při průměrné výšce píku $h_p = 2,01$ μ A byla problematická opakovatelnost charakterizována směrodatnou odchylkou $s = 0,64$ μ A a relativní směrodatnou odchylkou $s_r = 31,8$ %.

Proto byla hledána příčina daných problémů a podezření padlo na přítomnost kyslíku v měřicím systému. Nepřítomnost kyslíku v prostoru elektrochemického detektoru byla zajištěna probubláváním roztoku dusíkem po dobu 5 minut před analýzou, v průběhu analýzy bylo bubláno nad roztok. Dále byl dusíkem kontinuálně probubláván nosný roztok a vzorky před nadávkováním.

Odezva detektoru na nástřik nosného elektrolytu (BR pufr o pH 7,0) bez analytu a na nástřik rozpouštědla analytu (deionizovanou vodu) je na Obr. 6.2. Dále byl sledován rozdíl odezev při zařazení a absenci odstraňování kyslíku v roztoku v promývače autosampleru. Tento roztok uzavírá zónu dávkovaného vzorku. Příklady zaznamenaných křivek ukazuje Obr. 6.2. Výšky píku byly statisticky vyhodnoceny (viz Tab. 6.1). Z Tab. 6.1 je patrné, že rozdíl výšek píků při nástřiku deionizované vody a BR pufru nejsou významné, tj. vodivost zóny je ovlivněna kyslíkem. Ani odstranění kyslíku z promývačky autosampleru nevedlo k poklesu výšky píku, došlo pouze

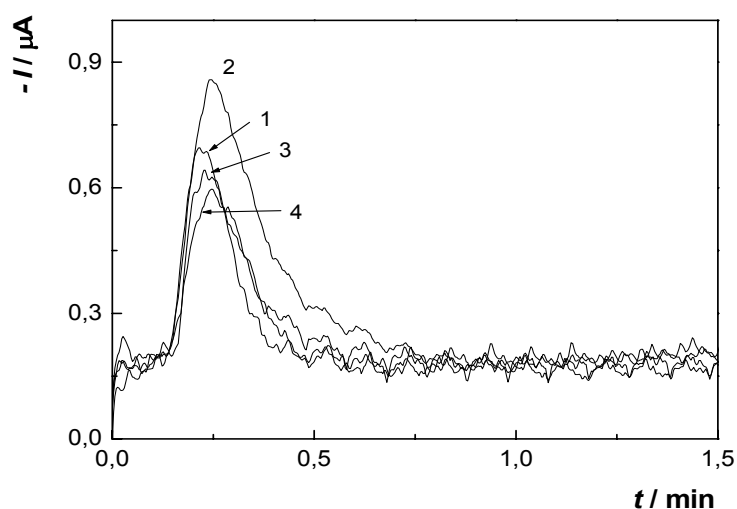
k mírnému zlepšení reprodukovatelnosti odezvy detektoru. Dále je z Tab. 6.1 zřejmé, že za těchto podmínek stanovení je výška píku po nástřiku BR pufru asi třetinová v porovnání s píkem Carmustinu, nicméně stejně nereprodukovatelná.

Kolísající hodnoty odezvy byly nejspíše způsobeny kyslíkem, kdy docházelo při každém nadávkování vzorku autosamplrem k nasátí určitého množství vzduchu, jak je vidět na Obr. 6.3. převzatého z manuálu⁴⁸.



Obr. 6.1.

Odezva elektrochemického detektoru na Carmustin ve vodě ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$). FIA-ED s velkoplošnou m-AgSAE při $E_{det} = -0,8 \text{ V}$. Nosný elektrolyt BR pufr o pH 7,0; průtoková rychlost 1 ml min^{-1} ; dávkovaný objem $10 \mu\text{l}$. Číslo křivky odpovídá číslu měření.



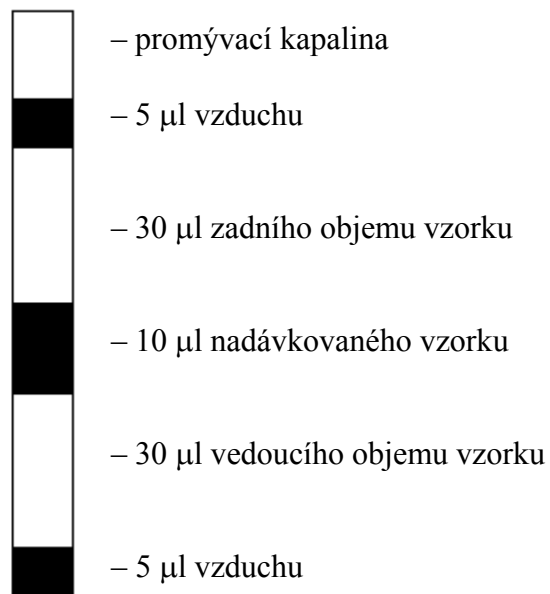
Obr. 6.2.

Odezva elektrochemického detektoru při nástřiku BR pufru o pH 7,0 při přítomnosti (1) a odstranění kyslíku (3) a deionizované vody při přítomnosti (2) a odstranění kyslíku (4) z promývačky autosampleru. FIA-ED s velkoplošnou m-AgSAE při $E_{det} = -0,8$ V. Nosný elektrolyt BR pufr o pH 7,0; dávkováno 10 μ l; průtoková rychlost 1 ml min⁻¹.

Tab. 6.1.

Statistické vyhodnocení výšek píku h_p při dávkování BR pufru o pH 7,0 a deionizované vody. FIA-ED s velkoplošnou m-AgSAE při $E_{det} = -0,8$ V. Nosný elektrolyt BR pufr o pH 7,0; dávkováno 10 μ l; průtoková rychlost 1 ml min⁻¹ (vyhodnoceno ze čtyř záznamů).

přítomnost kyslíku v promývačce autosampleru	vzorek	průměr h_p [μ A]	s [μ A]	s_r [%]
ano	BR pufr pH 7,0	0,663	0,395	59,58
	deionizovaná voda	0,769	0,333	43,30
ne	BR pufr pH 7,0	0,650	0,308	47,38
	deionizovaná voda	0,547	0,130	23,77



Obr. 6.3.

Princip dávkování vzorku metodou Cut Injection, převzato z manuálu⁴⁸.

6.2 Stanovení Carmustinu za použití ručního dávkování

V důsledku problémů s kolísajícími hodnotami proudových odezev, které byly způsobeny používaným autosamplerem, bylo přistoupeno k měření na přístroji využívajícího ruční dávkování zóny analytu smyčkou přímo do proudu nosného elektrolytu.

Na počátku samotného měření bylo testováno, zda-li se i zde nebude objevovat problém s kyslíkem při nadávkování vzorku. Opět byl dávkován samotný nosný elektrolyt BR pufr o pH 7,0, ethanol, v němž byl Carmustin rozpuštěn, a deionizovaná voda. Nepřítomnost kyslíku v prostoru elektrochemického detektoru byla zajištěna probubláváním roztoku dusíkem po dobu 5 minut před analýzou, v průběhu analýzy bylo bubláno nad roztok. Před vstupem dusíku do nádoby byla zařazena promývačka obsahující deionizovanou vodu. Dále byl dusíkem kontinuálně probubláván nosný roztok a vzorky před nadávkováním.

Naměřená data byla statisticky vyhodnocena (viz Tab. 6.2). Hodnota relativní směrodatné odchylky do 5 % svědčí o možném použití metody FIA-ED pro stanovení Carmustinu, a proto byla provedena optimalizace metody.

Tab. 6.2.

Statistické vyhodnocení výšek h_p a ploch A_p píku nosného roztoku, ethanolu a deionizované vody. FIA-ED s velkoplošnou m-AgSAE při $E_{det} = -1,2$ V (vyhodnoceno ze tří záznamů). Nosný roztok BR pufr o pH 7,0; průtoková rychlost 1 ml min^{-1} ; dávkováno $20 \mu\text{l}$.

nástřík	výška h_p				plocha A_p		
	průměr [μA]	s [μA]	s_r [%]		průměr [$\mu\text{A s}$]	s [$\mu\text{A s}$]	s_r [%]
BR pufr pH 7,0	0,290	0,006	2,07		0,670	0,030	4,48
ethanol	2,130	0,050	2,35		4,340	0,020	0,46
deionizovaná voda	0,360	0,001	0,28		0,740	0,020	2,70

6.2.1 Optimalizace metody

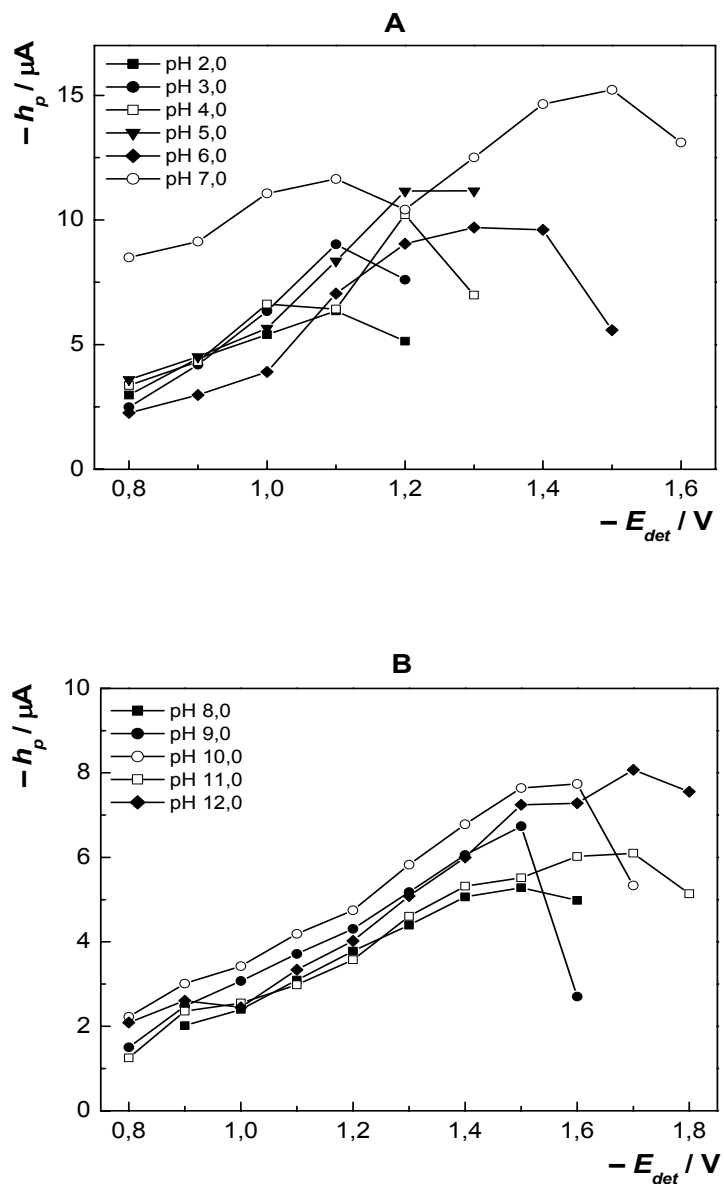
6.2.1.1 Vliv pH nosného elektrolytu a potenciálu vloženého na pracovní elektrodu

Z voltametrických studií (viz kap. 3) vyplývá, že pH prostředí zásadně ovlivňuje potenciál redukce a intenzitu odezvy m-AgSAE. Proto byly hydrodynamické voltamogramy (závislosti odezvy detektoru na vloženém potenciálu) proměřeny v prostředí BR pufru o pH (2,0 – 12,0), přičemž na pracovní elektrodu byl postupně vkládán potenciál od –0,8 V do –1,8 V. Hydrodynamické voltamogramy pro různé hodnoty pH BR pufru jsou ukázány na Obr. 6.4.

Potenciál, při kterém bylo dosaženo proudového maxima, se s rostoucím pH posouval k negativním hodnotám, tj. od –1,1 V při pH 2,0 do –1,7 V při pH 12,0, vzhledem k účasti H^+ iontů na redukci *N*-nitrososkupiny na hydroxylaminoskupinu. Výška píku v maximu rostla s rostoucím pH až do pH 7,0 a pro vyšší pH začala klesat. Zároveň výška píku rostla s rostoucím záporným potenciálem detekce vždy do určitého maxima a poté nastal pokles v oblasti nárůstu proudu pozadí.

Tato studie vlivu pH na chování Carmustinu při FIA-ED na velkoplošné m-AgSAE ukazuje obdobné chování jako v případě DC voltametrie na klasické m-AgSAE. Při DC voltametii se potenciál vlny s rostoucím pH až do pH 6,0 posouval také k negativním hodnotám, vzhledem k účasti H^+ iontů na redukci *N*-nitrososkupiny na hydroxylaminoskupinu, od pH 7,0 byl potenciál vlny téměř konstantní. S rostoucím pH ale docházelo k poklesu výšky vlny, od pH 11,0 nebyla již voltametrická vlna pozorována. Při DC voltametii bylo jako optimální zvoleno prostředí BR pufru o pH 7,0, kdy látka poskytovala opakovatelné a vzhledem k maximálnímu rozdílu potenciálu redukce a úniku základního elektrolytu i snadno vyhodnotitelné vlny (viz Obr. 4.1 na str. 36).

Při FIA-ED byl jako optimální zvolen nosný roztok BR pufr o pH 7,0, kdy odezva detektoru na Carmustin dosahovala nejvyšších proudových hodnot a zvolen potenciál detekce –1,5 V, což byl potenciál proudového maxima v tomto prostředí.



Obr. 6.4

Závislost výšky píku h_p Carmustinu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) na vloženém potenciálu E_{det} . FIA-ED s velkoplošnou $m\text{-AgSAE}$. Nosný roztok BR pufr o pH 2,0 – 7,0 (A) a 8,0 – 12,0 (B); průtoková rychlost 1 ml min^{-1} ; dávkováno $20 \mu\text{l}$.

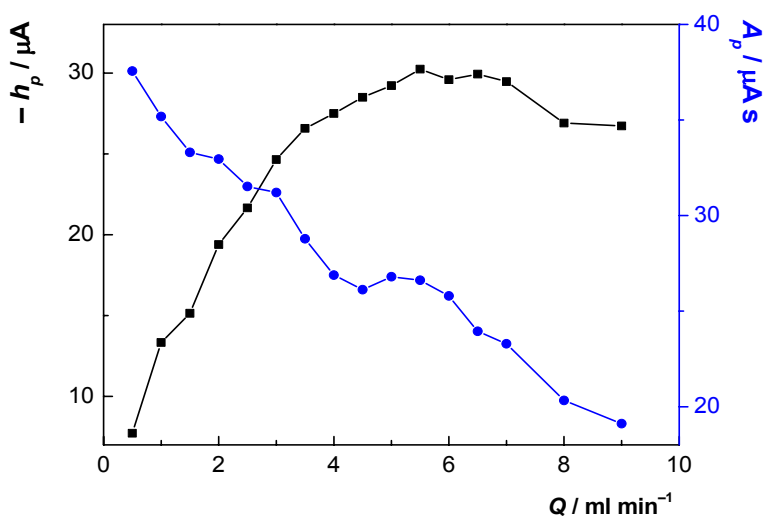
6.2.1.2 Vliv průtokové rychlosti

Po zjištění optimální hodnoty pH BR pufru a potenciálu vkládaného na pracovní elektrodu byl sledován vliv průtokové rychlosti nosného roztoku na odezvu

elektrochemického detektoru. Závislosti výšek, ploch a šířek píku byly proměřeny v rozsahu průtokových rychlostí od 0,5 do 9,0 ml min⁻¹ a jsou ukázány na Obr. 6.5 a 6.6.

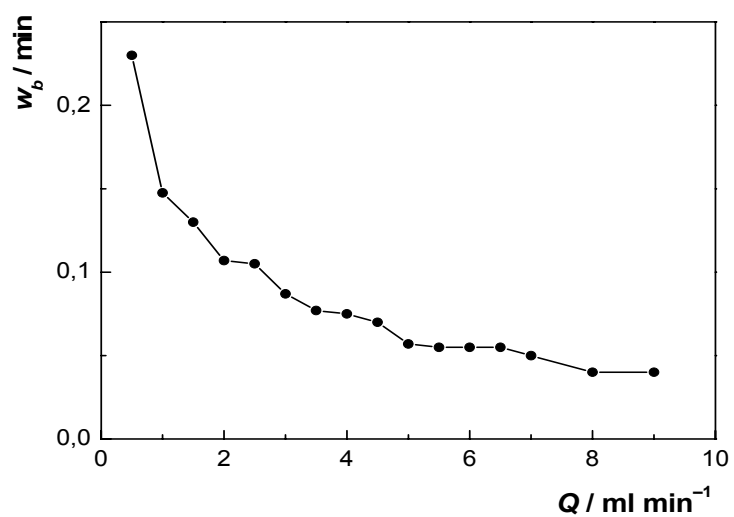
Z Obr. 6.5 je zřejmé, že plocha píku s rostoucí průtokovou rychlostí klesá a výška píku naopak roste. V rozmezí hodnot od 4,5 do 7,0 ml min⁻¹ je výška píku téměř konstantní a od 7,0 ml min⁻¹ dochází k mírnému poklesu. Zároveň docházelo s rostoucí průtokovou rychlostí k poklesu šířky píku (viz Obr. 6.6).

Jako optimální byla zvolena průtoková rychlost 5,5 ml min⁻¹ z rozsahu rychlostí, při nichž byla proudová odezva relativně stálá.



Obr. 6.5

Závislost výšky h_p a plochy A_p píku Carmustinu ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol l⁻¹) na průtokové rychlosti Q . FIA-ED s velkoplošnou m-AgSAE při $E_{det} = -1,5$ V. Nosný roztok BR pufr o pH 7,0; dávkováno 20 μl.



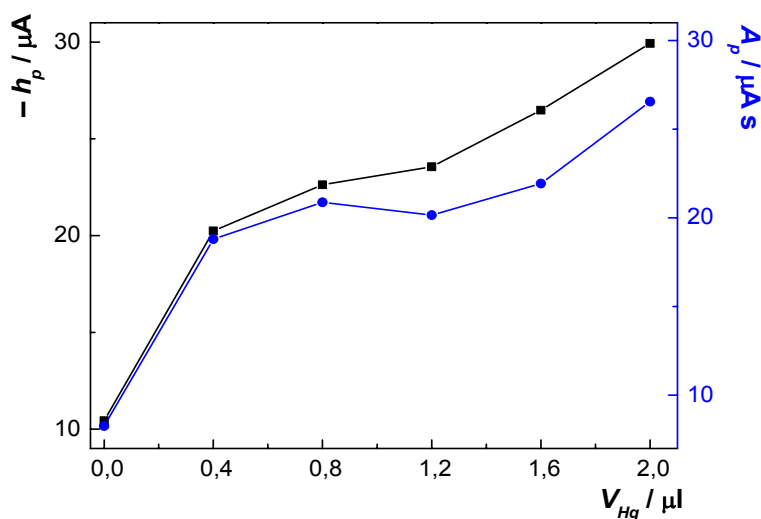
Obr. 6.6

Závislost šířky píku w_b Carmustinu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) na průtokové rychlosti Q . FIA-ED s velkoplošnou $m\text{-AgSAE}$ při $E_{det} = -1,5 \text{ V}$. Nosný roztok BR pufr o pH 7,0; dávkováno 20 μl .

6.2.1.3 Vliv množství rtuti

Posledním zjišťovaným parametrem bylo množství rtuti použité k vytvoření menisku velkoplošné m-AgSAE. Rtuť byla nanášena na vyleštěný povrch elektrody pomocí Hamiltonovy injekční stříkačky. Závislosti výšek a ploch píku byly proměřeny v rozsahu od 0 do 2,0 μl a jsou znázorněny na Obr. 6.7.

Z Obr. 6.7 je patrné, že se zvyšujícím se množstvím rtuti roste výška i plocha píku. Jako optimální bylo zvoleno 0,4 μl , protože při vyšších objemech rtuti hrozilo její odkápnutí při neopatrné manipulaci s elektrodou a objem rtuti je vhodné minimalizovat vzhledem k toxikologickým výhradám k tomuto kovu. Nicméně bylo zjištěno, že meniskus rtuti je i při vyšších průtokových rychlostech stabilní a nedojde k jeho odtržení vlivem proudu nosného elektrolytu.



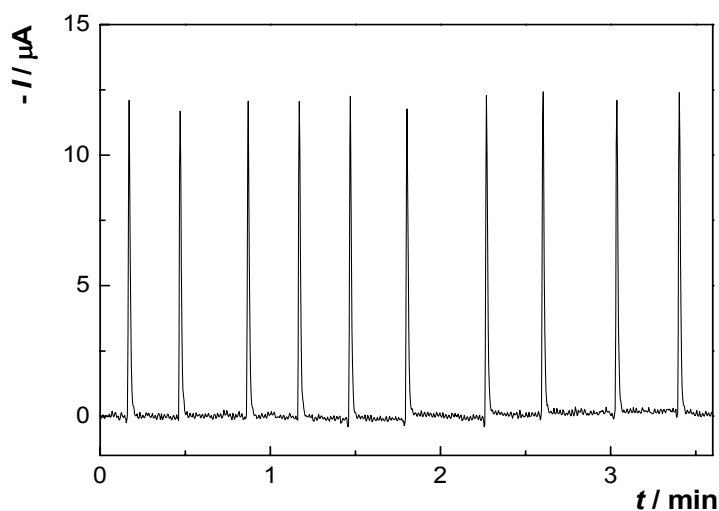
Obr. 6.7

Závislost výšky h_p a plochy A_p píku Carmustinu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) na množství rtuti na povrchu elektrody V_{Hg} . FIA-ED s velkoplošnou m-AgSAE při $E_{\text{det}} = -1,5 \text{ V}$. Nosný roztok BR pufr o pH 7,0; průtoková rychlost $5,5 \text{ ml min}^{-1}$; dávkováno 20 μl .

6.2.2 Opakovatelnost měření při FIA-ED

Po zjištění optimálních podmínek byla proměřena stálost a opakovatelnost signálu elektrochemického detektoru při nejvyšší používané koncentraci Carmustinu v prostředí BR pufru o pH 7,0. Dávkováno bylo 20 μl roztoku Carmustinu o koncentraci $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$ za použití průtokové rychlosti $5,5 \text{ ml min}^{-1}$, potenciálu detekce $-1,5 \text{ V}$ a množství rtuti $0,4 \mu\text{l}$. Záznam je uveden na Obr. 6.8. Statistické vyhodnocení odezvy elektrochemického detektoru pro deset nástřiků je uvedeno v Tab. 6.3.

Nízké hodnoty relativní směrodatné odchylky do 2,4 % svědčí o stabilitě odezvy detektoru.



Obr. 6.8

Odezva elektrochemického detektoru na Carmustin ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) při opakovaném nadávkování vzorku. FIA-ED s velkoplošnou m-AgSAE při $E_{\text{det}} = -1,5 \text{ V}$. Nosný roztok BR pufr o pH 7,0; průtoková rychlost $5,5 \text{ ml min}^{-1}$; dávkováno $20 \mu\text{l}$.

Tab. 6.3

Statistické vyhodnocení stálosti odezvy elektrochemického detektoru ($n = 10$) při opakovaném nadávkování vzorku Carmustinu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$). FIA-ED s velkoplošnou m-AgSAE při $E_{det} = -1,5 \text{ V}$. Nosný roztok BR pufr o pH 7,0; průtoková rychlost $5,5 \text{ ml min}^{-1}$; dávkováno $20 \text{ } \mu\text{l}$. Vyhodnoceno z výšky h_p a plochy A_p píku.

výška h_p				plocha A_p			
průměr	s	s_r	$L_{1/2}$	průměr	s	s_r	$L_{1/2}$
[μA]	[μA]	[%]	[μA]	[$\mu\text{A s}$]	[$\mu\text{A s}$]	[%]	[$\mu\text{A s}$]
11,82	0,22	1,86	0,15	9,41	0,22	2,34	0,17

6.2.3 Koncentrační závislost

Po provedení optimalizace FIA metody byla proměřena kalibrační závislost Carmustinu v koncentračním rozmezí $(2 - 10) \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ (Obr. 6.9) a $(6 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ (Obr. 6.10).

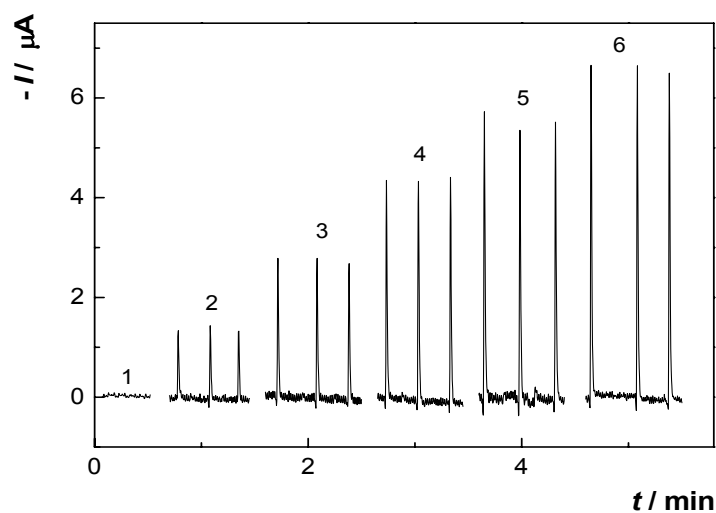
Pro koncentraci nižší než $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ již nebylo možno získané chromatogramy vyhodnotit.

Naměřené kalibrační závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese. Kalibrační přímky byly vyhodnoceny jako závislosti výšky píku na koncentraci Carmustinu (Obr. 6.11) a závislosti plochy píku na koncentraci Carmustinu (Obr. 6.12). Parametry kalibračních přímek pro stanovení Carmustinu v prostředí BR pufru o pH 7,0, hodnoty meze stanovitelnosti (L_Q) a meze detekce (L_D) jsou uvedeny v Tab. 6.4 a Tab. 6.5.

Kalibrační závislosti jsou lineární v celém koncentračním rozmezí, korelační koeficienty kalibračních přímek se pohybují v rozmezí od 0,9992 do 0,9999.

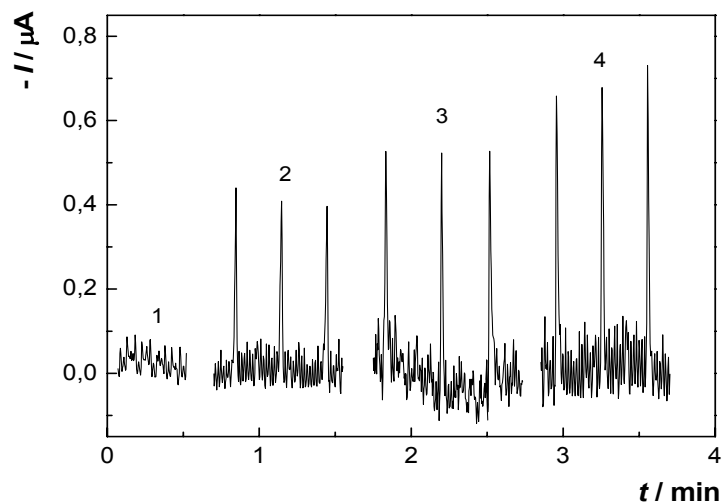
Při koncentraci $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ z nejnižšího dosaženého koncentračního řádu byla určena opakovatelnost měření ($n = 10$). Statistické zpracování naměřených dat je uvedeno v Tab. 6.6.

Bylo dosaženo meze stanovitelnosti $7,2 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ a meze detekce $2,2 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ (viz Obr. 6.10).



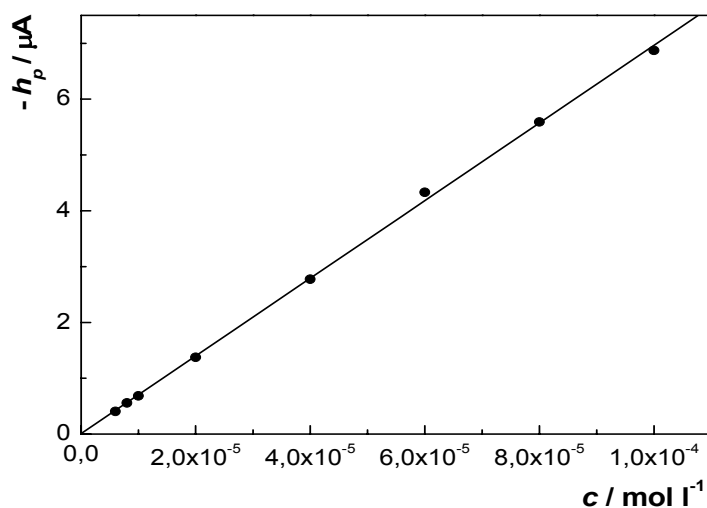
Obr. 6.9

Záznam píků FIA-ED stanovení Carmustinu s velkoplošnou *m*-AgSAE při $E_{det} = -1,5$ V. Nosný roztok BR pufr o pH 7,0; průtoková rychlost $5,5 \text{ ml min}^{-1}$; dávkovaný objem 20 μl ; množství rtuti $0,4 \text{ μl}$; c (Carmustinu) = 0 (1), $2 \cdot 10^{-5}$ (2), $4 \cdot 10^{-5}$ (3), $6 \cdot 10^{-5}$ (4), $8 \cdot 10^{-5}$ (5), $1 \cdot 10^{-4}$ (6) mol l^{-1} .



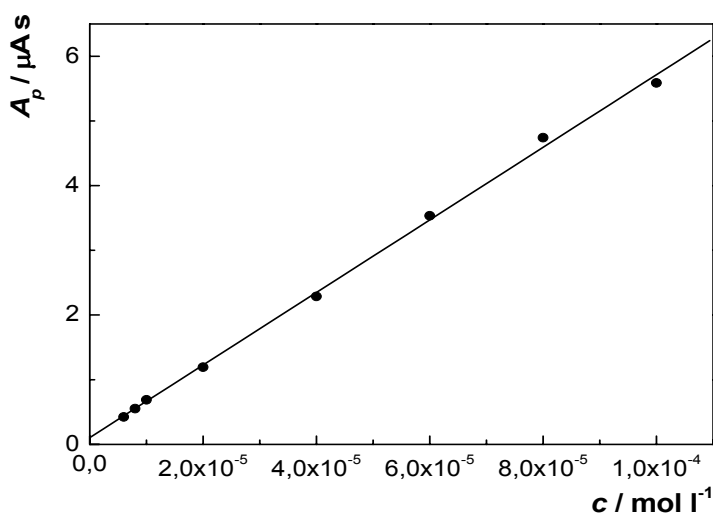
Obr. 6.10

Záznam píků FIA-ED stanovení Carmustinu s velkoplošnou *m*-AgSAE při $E_{det} = -1,5$ V. Nosný roztok BR pufr o pH 7,0; průtoková rychlost $5,5 \text{ ml min}^{-1}$; dávkovaný objem 20 μl ; množství rtuti $0,4 \text{ μl}$; c (Carmustinu) = 0 (1), $6 \cdot 10^{-6}$ (2), $8 \cdot 10^{-6}$ (3), $1 \cdot 10^{-5}$ (4) mol l^{-1} .



Obr. 6.11

Závislost výšky píku h_p na koncentraci Carmustinu v rozmezí $6 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. FIA-ED s velkoplošnou m-AgSAE při $E_{det} = -1,5 \text{ V}$. Nosný roztok BR pufr o pH 7,0; průtoková rychlost $5,5 \text{ ml min}^{-1}$; dávkováno $20 \mu\text{l}$.



Obr. 6.12

Závislost plochy píku A_p na koncentraci Carmustinu v rozmezí $6 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. FIA-ED s velkoplošnou m-AgSAE při $E_{det} = -1,5 \text{ V}$. Mobilní fáze BR pufr o pH 7,0; průtoková rychlost $5,5 \text{ ml min}^{-1}$; dávkováno $20 \mu\text{l}$.

Tab. 6.4

Parametry kalibrační závislosti vyhodnocené z výšek píku.

c [mol l ⁻¹]	směrnice [μA mol ⁻¹ l]	úsek [μA]	korelační koeficient	L_Q [mol l ⁻¹]	L_D [mol l ⁻¹]
$6 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4}$	$6,96 \cdot 10^4$	0,01	0,9996	$7,2 \cdot 10^{-6}$	$2,2 \cdot 10^{-6}$

Tab. 6.5

Parametry kalibrační závislosti vyhodnocené z ploch píku.

c [mol l ⁻¹]	směrnice [μA s mol ⁻¹ l]	úsek [μA s]	korelační koeficient	L_Q [mol l ⁻¹]	L_D [mol l ⁻¹]
$6 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4}$	$5,61 \cdot 10^4$	0,10	0,9992	$1,1 \cdot 10^{-5}$	$3,2 \cdot 10^{-6}$

Tab. 6.6

Statistické vyhodnocení opakovatelnosti ($n = 10$) odezvy elektrochemického detektoru při stanovení Carmustinu ($c = 6 \cdot 10^{-6}$ mol l⁻¹). FIA-ED s velkoplošnou m-AgSAE při $E_{det} = -1,5$ V. Nosný roztok BR pufr o pH 7,0; průtoková rychlost 5,5 ml min⁻¹; dávkováno 20 μl. Vyhodnoceno z výšky h_p a plochy A_p píku.

výška h_p				plocha A_p			
průměr	s	s_r	$L_{1/2}$	průměr	s	s_r	$L_{1/2}$
[μA]	[μA]	[%]	[μA]	[μA s]	[μA s]	[%]	[μA s]
0,54	0,05	9,26	0,04	0,41	0,06	14,6	0,05

7. Stanovení Carmustinu vysokoučinnou kapalinovou chromatografií

V této části bylo cílem ověřit, zda lze AgSAE použít pro stanovení Carmustinu v průtoku použitím mobilní fáze s organickým modifikátorem po zařazení kolony. Při zjišťování optimálních podmínek stanovení byla jako pracovní elektroda použita velkoplošná m-AgSAE, koncentrační závislost byla k porovnání proměřována na klasické m-AgSAE, používané v bakalářské práci, a velkoplošné AgSAE, lišící se úpravou povrchu (m-AgSAE, p-AgSAE a MF-AgSAE). Měření bylo prováděno na přístroji využívající k dávkování analytu autosampler.

7.1 Optimalizace metody

7.1.1 Mobilní fáze

V pracích^{12,14} uvedených v Tab. 1.2 bylo pro HPLC-UV stanovení doporučována mobilní fáze voda:methanol v poměru 1:1 (v/v). V této práci byla nejprve použita mobilní fáze obsahující BR pufr o pH 5,0:methanol také v poměru 1:1 (v/v). Z Obr. 7.1 je však vidět koeluce kyslíku s Carmustinem, proto byl poměr složek změněn na 60:40 (v/v), tak aby byla umožněna úplná separace kyslíku a Carmustinu (viz Obr. 7.2). Na Obr. 7.1 a Obr. 7.2 je pro srovnání uveden záznam získaný pomocí HPLC s UV a elektrochemickou detekcí, kdy je patrná detekce kyslíku pouze ze záznamu elektrochemického detektoru. Retenční charakteristiky Carmustinu a kyslíku jsou shrnuty v Tab. 7.1.

Je vidět, že i při stanovení po zařazení kolony se objevuje problém s přítomným kyslíkem (viz např. Obr. 7.9). Na Obr. 7.3 jsou zaznamenány chromatogramy, kdy byl Carmustin před prvním nadávkováním probubláván po dobu 5 minut dusíkem a poté ponechán v autosampleru ve vialce a 7x opakovaně nadávkován. Graficky je závislost výšky píku Carmustinu a kyslíku na číslu měření uvedena na Obr. 7.4. Z Obr. 7.3 a Obr. 7.4 je patrné, že v průběhu pokusu (7 x 10 minut) dochází k postupnému nárůstu signálu kyslíku, ale odezva Carmustinu se nemění.

V druhém měření nebyl vzorek před nadávkováním zbaven kyslíku probubláváním dusíkem (viz Obr. 7.5). Z Obr. 7.5 je vidět, že u vzorku nebublaného je odezva kyslíku i Carmustinu téměř konstantní po celou dobu.

Z dat je patrné, že vzorek před analýzou není nutné probublávat dusíkem pokud odezva kyslíku neinterferuje s odezvou stanovovaného analytu. V opačných případech by bylo nutné udržovat dávkované vzorky v inertní atmosféře a použít dávkovací systém zamezující přítomnost kyslíku v dávkované zóně.

Obdobný problém vyskytujícího se kyslíku při HPLC-ED nitrofenolů byl popsán v práci⁴⁹. Kyslík rozpuštěný v mobilní fázi způsoboval vyšší a méně stabilní proud pozadí. Při dávkování vzorku kyslík dal široký a poměrně vysoký pík interferující s píky analytů. Proto byla mobilní fáze kontinuálně bublána dusíkem, přepadová nádoba bublána dusíkem po dobu analýzy nad roztok a vzorky před dávkováním bublány 5 minut dusíkem. Za těchto podmínek byly píky zkoumaných látek dobře separované a ostré.

Stejných podmínek bylo použito i v této práci, přesto byly detekovány zbytky kyslíku pravděpodobně původem z dávkování autosamplerem, jak bylo popsáno v kapitole 6.1

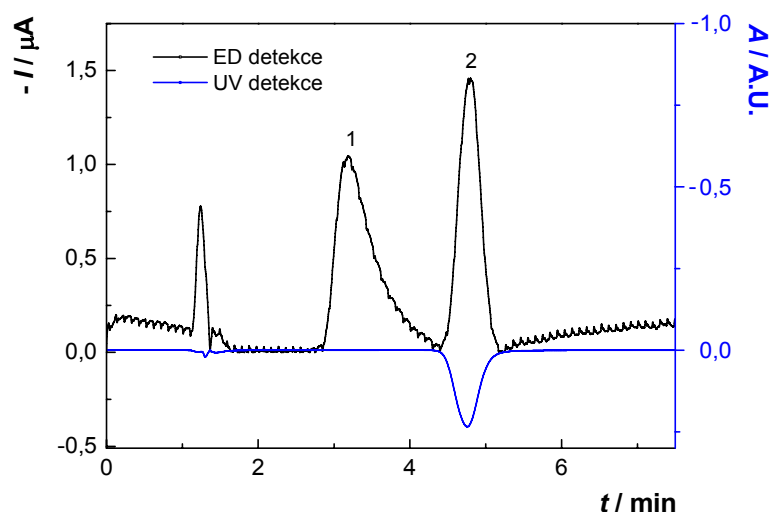
Tab. 7.1

Retenční charakteristiky Carmustinu a kyslíku. Dávkováno 10 μ l roztoku Carmustinu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$). HPLC-ED s velkoplošnou m-AgSAE při $E_{det} = -1,1 \text{ V}$. Mobilní fáze BR pufr o pH 5,0: methanol; průtoková rychlost 1 ml min^{-1} .

analyt	BR pufr:methanol (50:50)		BR pufr:methanol (60:40)	
	t_r [min]	k	t_r [min]	k
kyslík	3,14	1,62	3,55	1,96
Carmustin	4,79	2,99	8,59	6,16

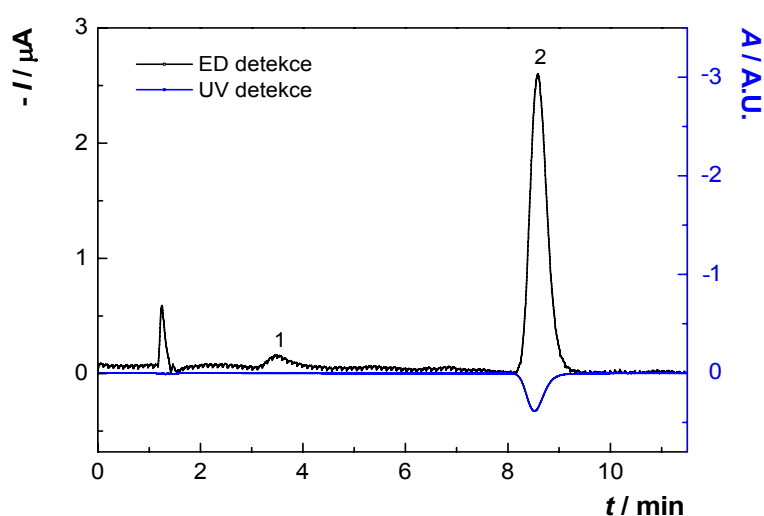
t_r – retenční čas

k – kapacitní faktor



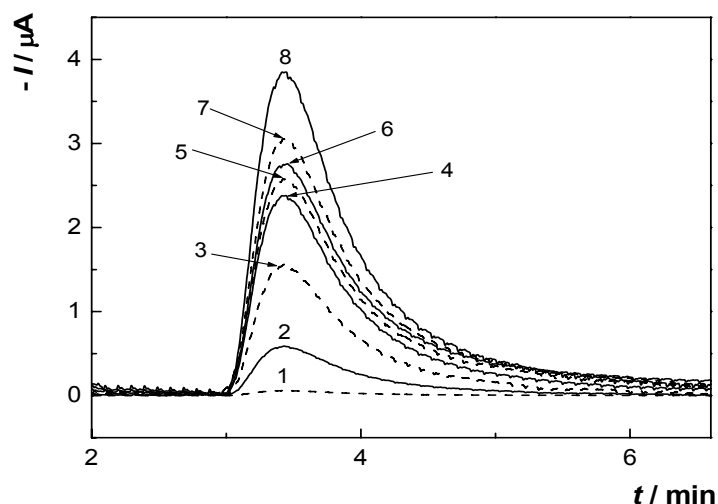
Obr. 7.1

Porovnání chromatogramů získaných pomocí HPLC s UV a ED detekcí. Dávkováno 10 μl roztoku Carmustinu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$). HPLC-UV při 230 nm a ED s velkoplošnou m-AgSAE při $E_{det} = -1,1 \text{ V}$. Mobilní fáze BR pufr o pH 5,0: methanol (50:50); průtoková rychlost 1 ml min^{-1} . Pík kyslíku (1), pík Carmustinu (2).



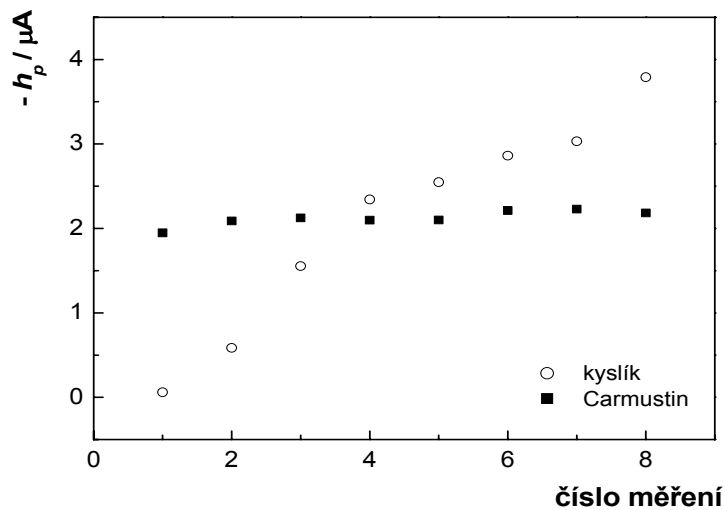
Obr. 7.2

Porovnání chromatogramů získaných pomocí HPLC s UV a ED detekcí. Dávkováno 10 μl roztoku Carmustinu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$). HPLC-UV při 230 nm a ED s velkoplošnou m-AgSAE při $E_{det} = -1,1 \text{ V}$. Mobilní fáze BR pufr o pH 5,0: methanol (60:40); průtoková rychlost 1 ml min^{-1} ; Pík kyslíku (1), pík Carmustinu (2).



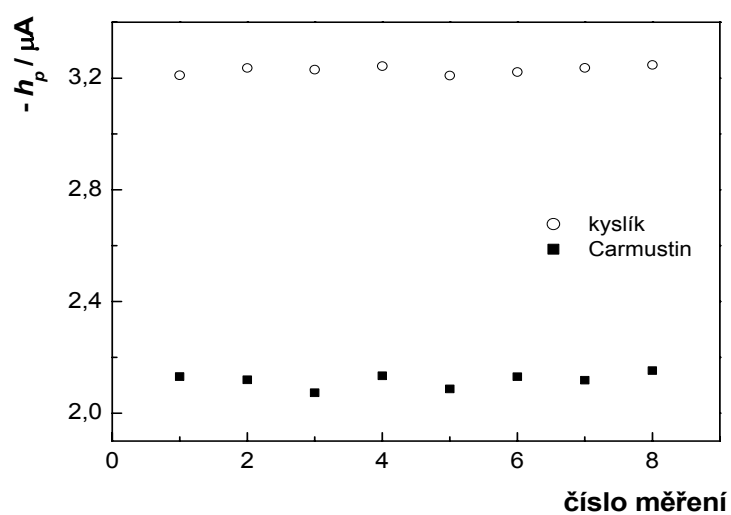
Obr. 7.3

Chromatogramy znázorňující nárůst piku kyslíku při opakovaném dávkování vzorku Carmustinu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$), který byl před prvním nadávkováním probubláván po dobu 5 minut dusíkem. HPLC-ED s velkoplošnou *m*-AgSAE při $E_{\text{det}} = -1,1 \text{ V}$. Mobilní fáze BR pufr pH 5,0: methanol (60:40); dávkováno $10 \mu\text{l}$; průtoková rychlost 1 ml min^{-1} . Číslo křivky odpovídá číslu měření.



Obr. 7.4

Závislost výšky piku h_p Carmustinu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) a kyslíku na počtu měření při opakovaném dávkování vzorku probubláném před prvním nástřikem po dobu 5 minut k odstranění kyslíku. HPLC-ED s velkoplošnou *m*-AgSAE při $E_{\text{det}} = -1,1 \text{ V}$. Mobilní fáze BR pufr o pH 5,0: methanol (60:40); průtoková rychlost 1 ml min^{-1} ; dávkováno $10 \mu\text{l}$.



Obr. 7.5

Závislost výšky píku h_p Carmustinu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) a kyslíku na počtu měření při opakovaném dávkování vzorku obsahujícího kyslík. HPLC-ED s velkoplošnou $m\text{-AgSAE}$ při $E_{det} = -1,1 \text{ V}$. Mobilní fáze BR pufr o $\text{pH } 5,0$:methanol (60:40); průtoková rychlost 1 ml min^{-1} ; dávkováno $10 \mu\text{l}$.

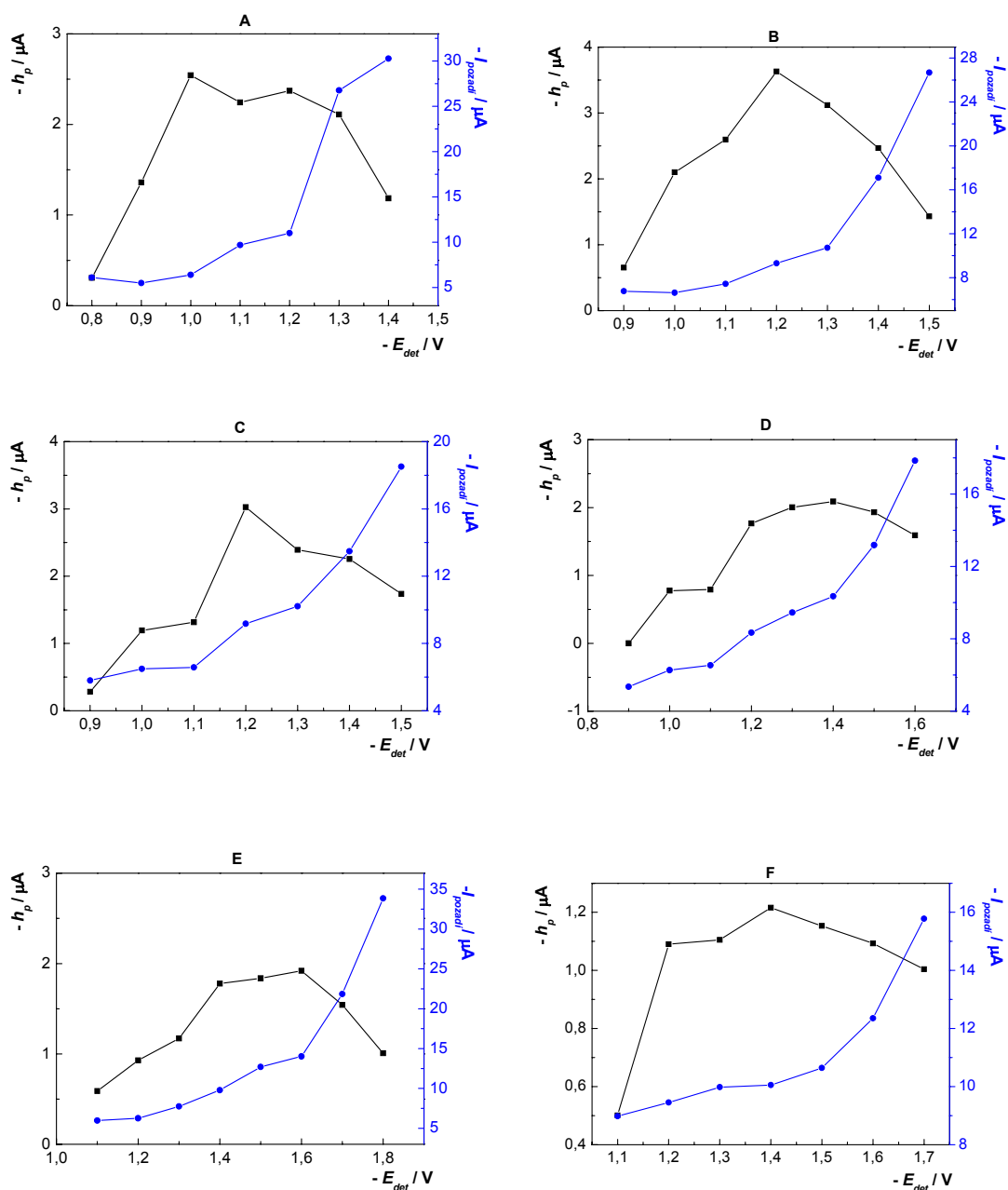
7.1.2 Vliv pH mobilní fáze a potenciálu vloženého na pracovní elektrodu

Nejprve byl optimalizován potenciál vkládaný na pracovní elektrodu proměřením hydrodynamických voltamogramů v prostředí mobilní fáze obsahující BR pufr o pH (2,0 – 7,0):methanol (60:40). Další zvyšování pH nebylo možné vzhledem k omezené stabilitě kolony při vyšších pH. Na pracovní elektrodu byl postupně vkládán potenciál od –0,8 V do –1,8 V. Hydrodynamické voltamogramy pro různé hodnoty pH BR pufru spolu s naměřenými hodnotami proudových pozadí jsou ukázány na Obr. 7.6.

Potenciál, při kterém bylo dosaženo proudového maxima se s rostoucím pH až do pH 6,0 posouval k negativním hodnotám, tj. od –1,0 V při pH 2,2 do –1,6 V při pH 6,0, vzhledem k účasti H^+ iontů na redukci *N*-nitrososkupiny na hydroxylaminoskupinu. Od pH 3,0 s rostoucím pH docházelo k poklesu výšky píku v maximu. Pro jednotlivá pH výška píku zároveň rostla s rostoucím záporným potenciálem detekce vždy do určitého maxima a poté nastal pokles v oblasti nárůstu proudu pozadí.

Jako optimální byla zvolena mobilní fáze složená z BR pufru o pH 3,0:methanol (60:40), kdy odezva detektoru na Carmustin dosahovala nejvyšších proudových hodnot a zvolen potenciál detekce –1,2 V, což byl potenciál proudového maxima v tomto prostředí.

Nahrazení univerzálního BR pufru v mobilní fázi fosfátovým pufrem o koncentraci $c = 0,01 \text{ mol l}^{-1}$ a $c = 0,04 \text{ mol l}^{-1}$ vedlo ke snížení výšky píku Carmustinu h_p o 66 %, proto byla k dalšímu měření použita mobilní fáze obsahující BR pufr.



Obr. 7.6

Závislost výšky píku h_p Carmustinu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) a proudu pozadí $I_{pozadí}$ na vloženém potenciálu E_{det} . HPLC-ED s velkoplošnou m-AgSAE. Mobilní fáze BR pufr:methanol (60:40) o pH BR pufru 2,2 (A), 3,0 (B), 4,0 (C), 5,0 (D), 6,0 (E) a 7,0 (F); dávkováno $10 \mu\text{l}$; průtoková rychlost 1 ml min^{-1} .

7.1.3 Vliv průtokové rychlosti

Po zjištění optimální hodnoty pH BR pufru a potenciálu vkládaného na pracovní elektrodu byl sledován vliv průtokové rychlosti nosného roztoku na odezvu elektrochemického a UV detektoru. Závislosti výšek a ploch píku byly proměřeny v rozsahu průtokových rychlostí od 0,5 do 2,0 ml min⁻¹. Závislosti výšky a plochy píku na průtokové rychlosti pro UV detektor jsou znázorněny na Obr. 7.7 a pro elektrochemický detektor na Obr. 7.8. Odezvy elektrochemického detektoru jsou uvedeny na Obr. 7.9. V Tab. 7.2 jsou shrnuty retenční časy kyslíku a Carmustinu při UV a elektrochemické detekci.

Pro UV detekci je z Obr. 7.7 zřejmé, že plocha píku s rostoucí průtokovou rychlostí klesá a výška píku kolísá. Pro elektrochemickou detekci je z Obr. 7.8 vidět, že plocha píku se s rostoucí průtokovou rychlostí příliš nemění a výška píku výrazně roste, neboť závislost limitního proudu i_L na průtokové rychlosti Q pro elektrochemický detektor je určena vztahem⁵⁰:

$$i_L = knFCD^{2/3}Q^x \quad (1),$$

kde i_L je limitní proud při daném potenciálu detekce (lze aproximovat výškou píku h_p), k je konstanta viskozity, n počet vyměněných elektronů, F Faradayova konstanta, C koncentrace analytu, D difúzní koeficient, Q průtoková rychlost a x je koeficient závisející na typu indikační elektrody. Hodnoty x pro různé typy detektorů publikované v práci⁵⁰ jsou uvedeny v Tab. 7.3. Hodnotu x lze určit po zlogaritmování vztahu (1) jako směrnici získané závislosti $\log i_L$ na $\log Q$, neboť zlogaritmováním rovnice (1) dostaneme:

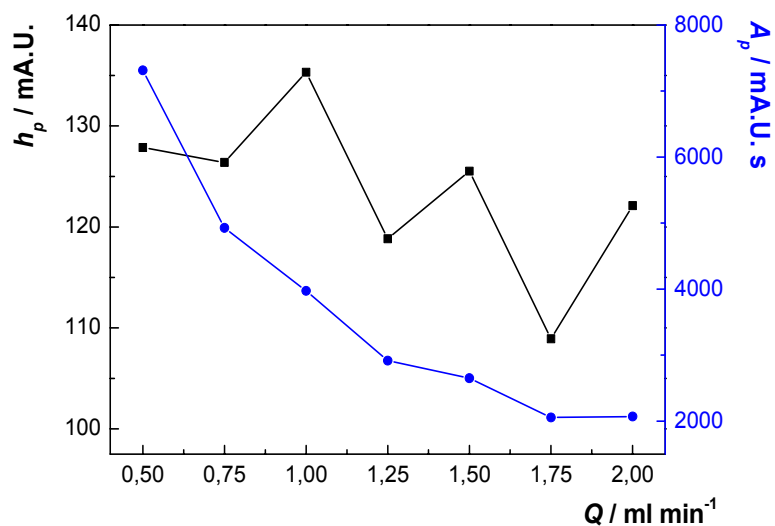
$$\log i_L = \log K + x \log Q \quad (2),$$

kde

$$K = knFD^{2/3}C \quad (3).$$

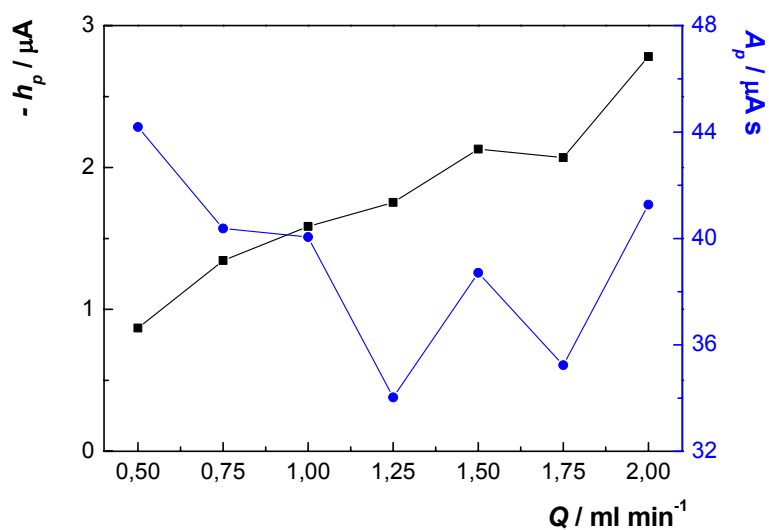
Závislost logaritmu výšky píku Carmustinu na logaritmu průtokové rychlosti je znázorněna na Obr. 7.10. Hodnota x , která je charakteristikou každého detektoru, byla stanovena ze směrnice závislosti a její hodnota činí 0,75 (viz Tab. 7.4). Z této tabulky je vidět, že zjištěná hodnota 0,75 je nejbližše hodnotě 0,7 odpovídající uspořádání „wall-jet“ detektoru používaném v našem případě.

Jako optimální průtoková rychlost byla zvolena rychlost 1 ml min⁻¹. Při nižších rychlostech byla odezva nižší a píky širší.



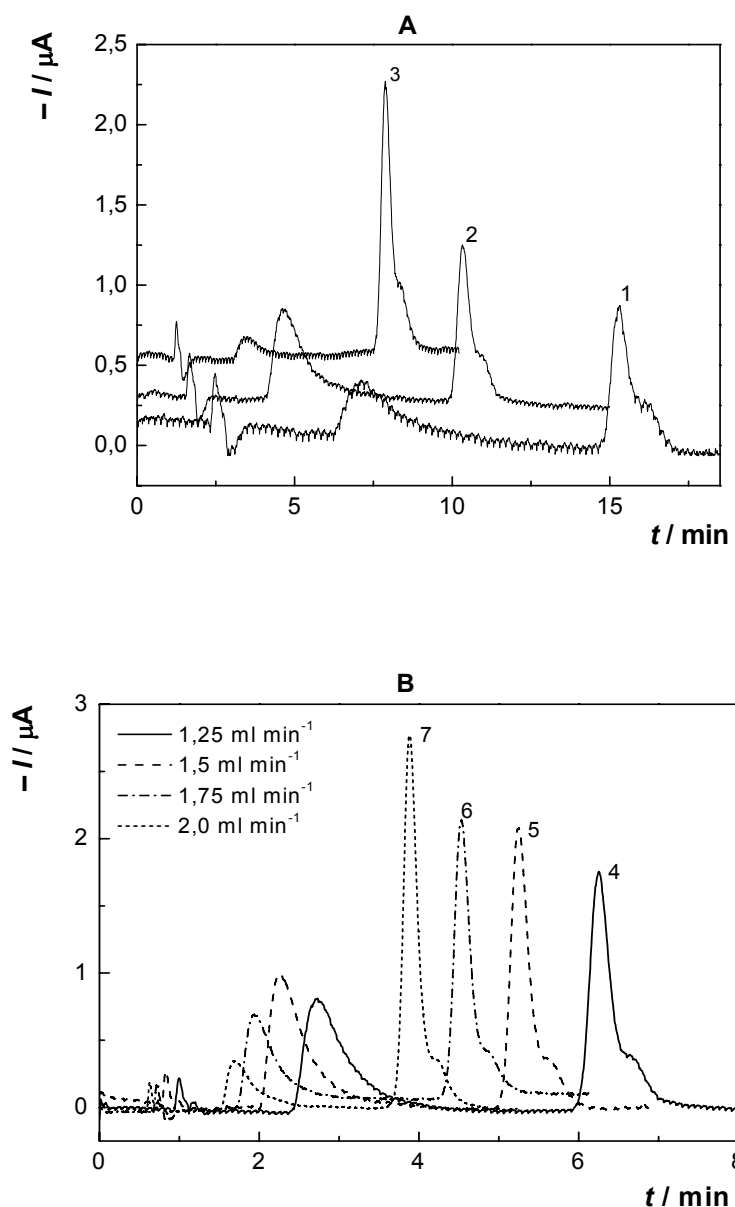
Obr. 7.7

Závislost výšky h_p a plochy A_p piku Carmustinu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) na průtokové rychlosti Q . HPLC-UV při 230 nm. Mobilní fáze BR pufr o pH 3,0:methanol (60:40); dávkováno 10 μl .



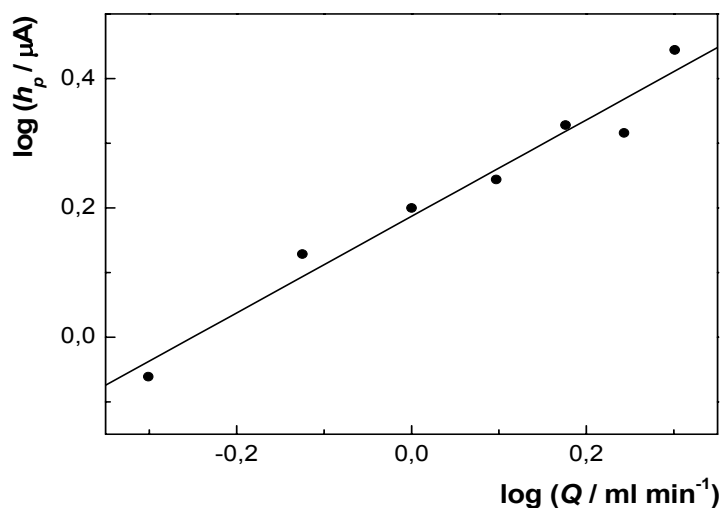
Obr. 7.8

Závislost výšky h_p a plochy A_p piku Carmustinu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) na průtokové rychlosti Q . HPLC-ED s velkoplošnou m-AgSAE při $E_{\text{det}} = -1,2 \text{ V}$. Mobilní fáze BR pufr o pH 3,0:methanol (60:40); dávkováno 10 μl .



Obr. 7.9

Chromatogramy Carmustinu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) při různých průtokových rychlostech Q . HPLC-ED s velkoplošnou $m\text{-AgSAE}$ při $E_{\text{det}} = -1,2 \text{ V}$. Mobilní fáze BR pufr o pH 3,0: methanol (60:40); dávkováno $10 \text{ } \mu\text{l}$; $Q = 0,5$ (1), $0,75$ (2), $1,0$ (3) ml min^{-1} – (viz Obr. A) a $1,25$ (4), $1,5$ (5), $1,75$ (6), $2,0$ (7) ml min^{-1} – (viz Obr. B).



Obr. 7.10

Závislost logaritmu výšky píku h_p Carmustinu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) na logaritmu průtokové rychlosti Q . HPLC-ED s velkoplošnou m-AgSAE při $E_{det} = -1,2 \text{ V}$. Mobilní fáze BR pufr o pH 3,0: methanol (60:40); dávkováno $10 \mu\text{l}$.

Tab. 7.2

Retenční časy Carmustinu a kyslíku při různých průtokových rychlostech Q . Dávkováno $10 \mu\text{l}$ roztoku Carmustinu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$). HPLC-UV při 230 nm a ED s velkoplošnou m-AgSAE při $E_{det} = -1,2 \text{ V}$. Mobilní fáze BR pufr o pH 3,0: methanol (60:40).

Q [ml min ⁻¹]	elektrochemická detekce		UV detekce
	t_r [min]		t_r [min]
	kyslík	Carmustin	Carmustin
0,5	7,06	15,30	15,13
0,75	4,61	10,32	10,24
1,0	3,44	7,82	7,77
1,25	2,73	6,22	6,17
1,5	2,25	5,19	5,15
1,75	1,94	4,52	4,50
2,0	1,69	3,88	3,86

Tab. 7.3

Hodnoty koeficientů x pro různé typy ampérometrických detektorů⁵⁰.

typ detektoru	„wall-jet“	cyklindrický	tenkovrstný
x	0,70	0,13	0,25

Tab. 7.4

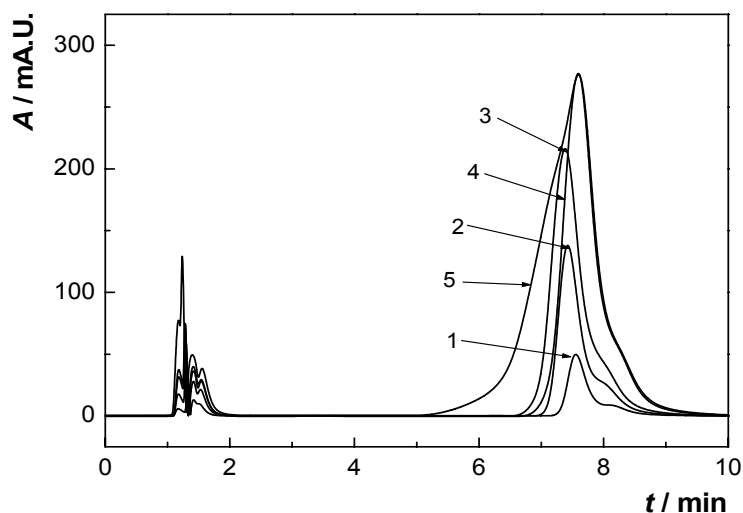
Parametry závislosti logaritmu výšky píku h_p Carmustinu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) na logaritmu průtokové rychlosti Q . HPLC-ED s velkoplošnou $m\text{-AgSAE}$ při $E_{\text{det}} = -1,2 \text{ V}$. Mobilní fáze BR pufr o pH 3,0: methanol (60:40); dávkováno 10 μl .

vzorek	směrnice	úsek	korelační koeficient
Carmustin	0,75	0,19	0,9807

7.1.4 Vliv dávkovaného objemu

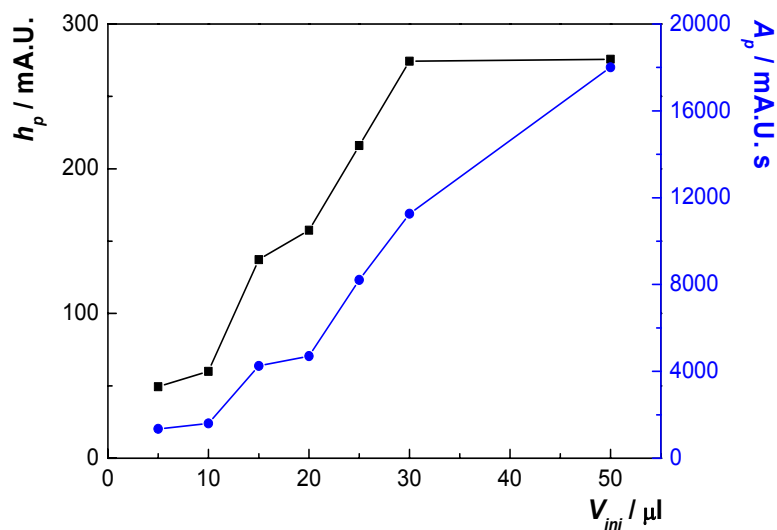
Následně byl sledován vliv dávkovaného objemu v rozmezí od 5 do 50 μl na odezvu UV a elektrochemického detektoru. Odezvy UV detektoru na Carmustin ukazuje Obr. 7.11 a odezvy elektrochemického detektoru Obr. 7.13. Závislost odezvy detektoru pro výšku a plochu píku na dávkovaném objemu jsou ukázány pro UV detektor na Obr. 7.12 a pro elektrochemický detektor na Obr. 7.14.

Z Obr. 7.12 a Obr. 7.14 je patrné, že výška i plocha píku pro oba detektory výrazně roste do objemu 30 μl , z Obr. 7.11 a Obr. 7.13 je ale zřejmé, že nad 25 μl se výrazně zvyšuje šířka píku. Jako optimální byl tedy zvolen objem 25 μl .



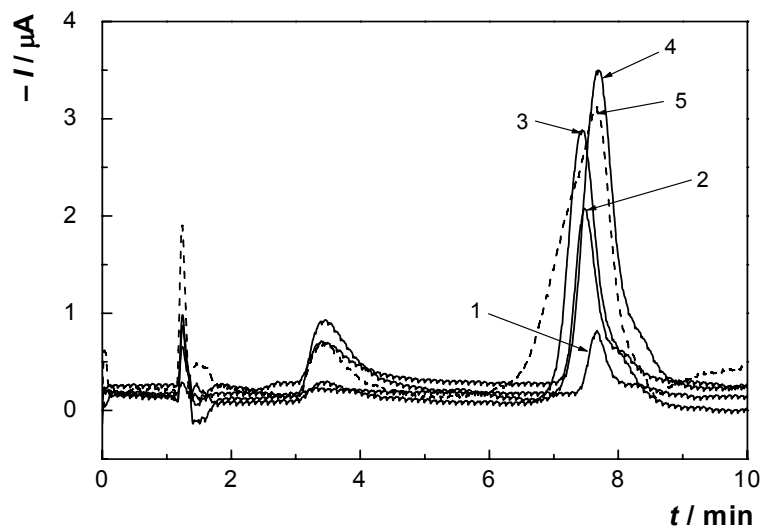
Obr. 7.11

Chromatogramy Carmustinu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) při různém dávkovaném objemu V_{inj} . HPLC-UV při 230 nm. Mobilní fáze BR pufr o pH 3,0: methanol (60:40); průtoková rychlost 1 ml min^{-1} ; $V_{inj} = 5$ (1), 15 (2), 25 (3), 30 (4), 50 (5) μl .



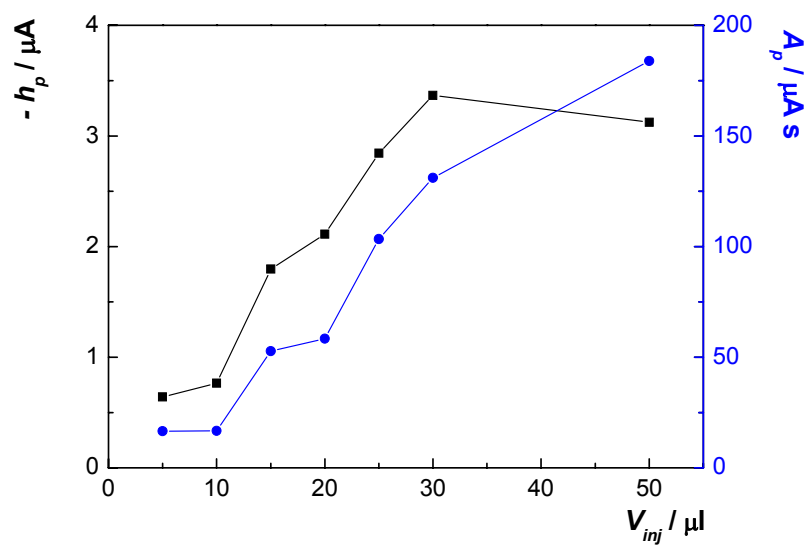
Obr. 7.12

Závislost výšky h_p a plochy A_p píku Carmustinu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) na dávkovaném objemu V_{inj} . HPLC-UV při 230 nm. Mobilní fáze BR pufr o pH 3,0: methanol (60:40); průtoková rychlost 1 ml min^{-1} .



Obr. 7.13

Chromatogramy Carmustinu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) při různém dávkovaném objemu V_{inj} . HPLC-ED s velkoplošnou $m\text{-AgSAE}$ při $E_{det} = -1,2 \text{ V}$. Mobilní fáze BR pufr o pH 3,0: methanol (60:40); průtoková rychlost 1 ml min^{-1} . $V_{inj} = 5$ (1), 15 (2), 25 (3), 30 (4), 50 (5) μl .



Obr. 7.14

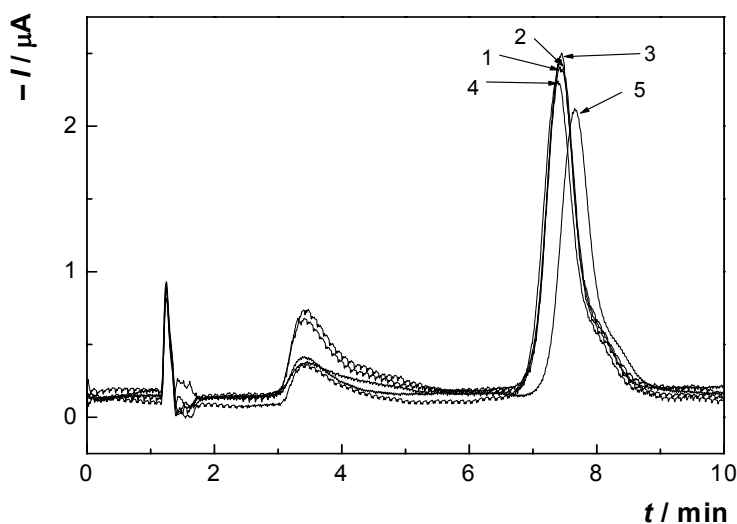
Závislost výšky h_p a plochy A_p píku Carmustinu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) na dávkovaném objemu V_{inj} . HPLC-ED s velkoplošnou m-AgSAE při $E_{det} = -1,2 \text{ V}$. Mobilní fáze BR pufr o pH 3,0: methanol (60:40); průtoková rychlost 1 ml min^{-1} .

7.1.5 Vliv vzdálenosti elektrody od ústí výtokové trubičky

V další části práce byla věnována pozornost elektrochemickému detektoru z hlediska vzdálenosti indikační velkoplošné m-AgSAE od ústí výtokové teflonové trubičky a množství rtuti použité k modifikaci povrchu elektrody.

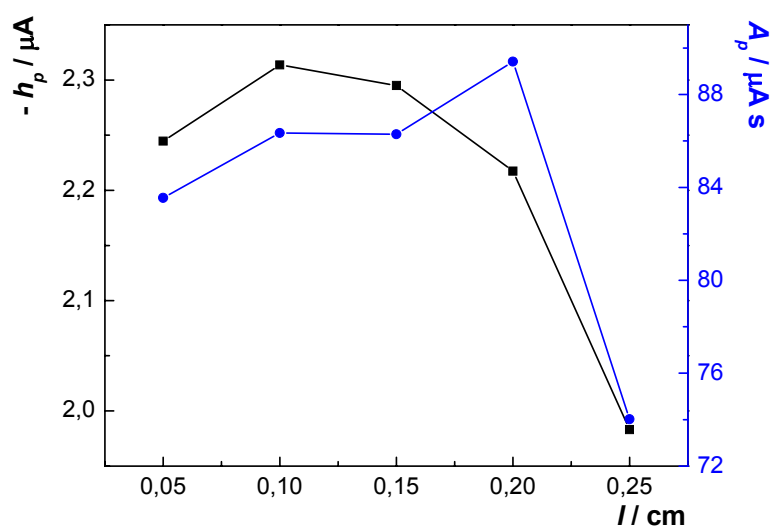
Chromatogramy Carmustinu zaznamenané pro vzdálenost 0,05 – 0,25 cm mezi m-AgSAE a ústím výtokové trubičky jsou znázorněny na Obr. 7.15. Vyhodnocené výšky a plochy píku pro různé vzdálenosti elektrody od ústí trubičky jsou ukázány na Obr. 7.16.

Z Obr. 7.16 je vidět, že hodnoty odezev pro vzdálenost 0,05 – 0,15 cm jsou téměř konstantní, poté výška i plocha píku klesá, pro měření bylo jako optimální zvolena minimální vzdálenost 0,05 cm.



Obr. 7.15

Chromatogramy Carmustinu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) při různých vzdálenostech elektrody od ústí výtokové trubičky 1. HPLC-ED s velkoplošnou m-AgSAE při $E_{\text{det}} = -1,2 \text{ V}$. Mobilní fáze BR pufr o pH 3,0: methanol (60:40); průtoková rychlost 1 ml min^{-1} ; dávkováno $25 \mu\text{l}$. $l = 0,05$ (1), $0,1$ (2), $0,15$ (3), $0,2$ (4), $0,25$ (5) cm.



Obr. 7.16

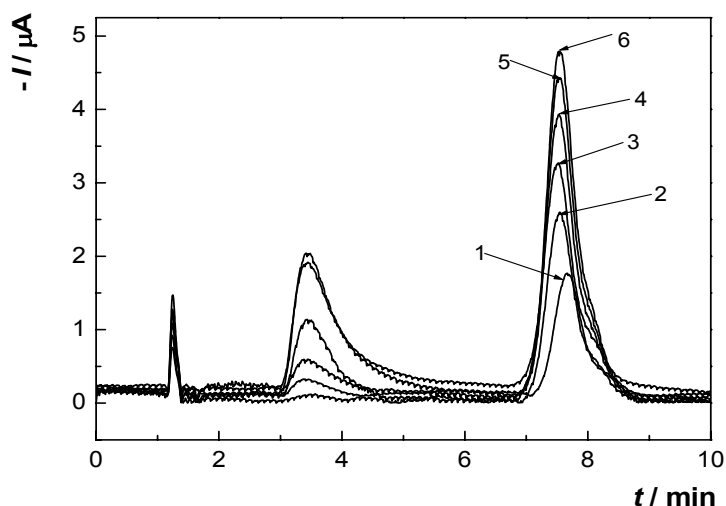
Závislost výšky h_p a plochy A_p píku Carmustinu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) na vzdálenosti elektrody od ústí výtokové trubičky l . HPLC-ED s velkoplošnou $m\text{-AgSAE}$ při $E_{\text{det}} = -1,2 \text{ V}$. Mobilní fáze BR pufr o pH 3,0: methanol (60:40); průtoková rychlost 1 ml min^{-1} ; dávkováno $25 \mu\text{l}$.

7.1.6 Vliv množství rtuti

Posledním optimalizovaným parametrem bylo množství rtuti použité k vytvoření menisku. Rtuť byla nanášena na vyleštěný povrch elektrody pomocí Hamiltonovy injekční stříkačky.

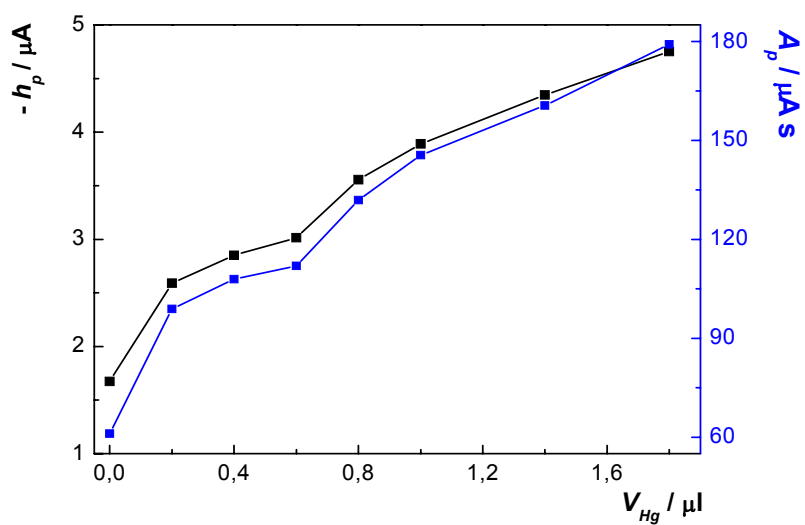
Chromatogramy Carmustinu zaznamenané pro objem rtuti 0 – 1,4 μl jsou znázorněny na Obr. 7.17. Závislosti výšky a plochy píku pro různé množství rtuti jsou uvedeny na Obr. 7.18.

Jako optimální bylo jak při FIA-ED zvoleno 0,4 μl , neboť při vyšších objemech hrozilo při neopatrné manipulaci s elektrodou nebezpečí odkápnutí menisku rtuti.



Obr. 7.17

Chromatogramy Carmustinu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) při různém objemu rtuti na povrchu elektrody V_{Hg} . HPLC-ED s velkoplošnou $m\text{-AgSAE}$ při $E_{\text{det}} = -1,2 \text{ V}$. Mobilní fáze BR pufr o pH 3,0: methanol (60:40); průtoková rychlost 1 ml min^{-1} ; dávkováno 25 μl , vzdálenost elektrody od ústí výtokové trubičky 0,05 cm. $V_{\text{Hg}} = 0$ (1), 0,2 (2), 0,6 (3), 1,0 (4), 1,4 (5), 1,8 (6) μl .



Obr. 7.18

Závislost výšky h_p a plochy A_p píku Carmustinu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$) na objemu rtuti na povrchu elektrody V_{Hg} . HPLC-ED s velkoplošnou m-AgSAE při $E_{det} = -1,2 \text{ V}$. Mobilní fáze BR pufr o pH 3,0: methanol (60:40); průtoková rychlost 1 ml min^{-1} ; dávkováno $25 \mu l$, vzdálenost elektrody od ústí trubičky $0,05 \text{ cm}$.

7.2 Koncentrační závislost

Po určení optimálních podmínek bylo přistoupeno k proměření koncentrační závislosti Carmustinu s ampérometrickou detekcí na velkoplošné m-AgSAE, p-AgSAE a MF-AgSAE a klasické m-AgSAE používané v bakalářské práci. Pro porovnání byla vyhodnocena i UV detekce při vlnové délce odpovídající absorpčnímu maximu $\lambda_{max} = 230$ nm. Zjištěné optimální podmínky použité k měření byly: Mobilní fáze připravená smísením BR pufru o pH 3,0 a methanolu v poměru 60:40 (v/v), potenciál pracovní elektrody $-1,2$ V, průtoková rychlost mobilní fáze 1 ml min^{-1} , dávkovaný objem $25 \text{ } \mu\text{l}$, a vzdálenost elektrody od ústí výtokové trubičky $0,05 \text{ cm}$.

7.2.1 Velkoplošná meniskem modifikovaná stříbrná tuhá amalgamová elektroda

Koncentrační závislost Carmustinu byla proměřena metodou HPLC-ED na velkoplošné m-AgSAE (objem rtuti $0,4 \text{ } \mu\text{l}$) v prostředí mobilní fáze BR pufru o pH 3,0: methanol v poměru 60:40 (v/v) v rozmezí $(1 - 10) \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$. Chromatogramy Carmustinu jsou uvedeny na Obr. 7.19. Pro koncentraci nižší než $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ již nebylo možno získané chromatogramy vyhodnotit. Z Obr. 7.19 je zřejmé, že detekce nižších koncentrací je znemožněna díky relativně vysokému šumu.

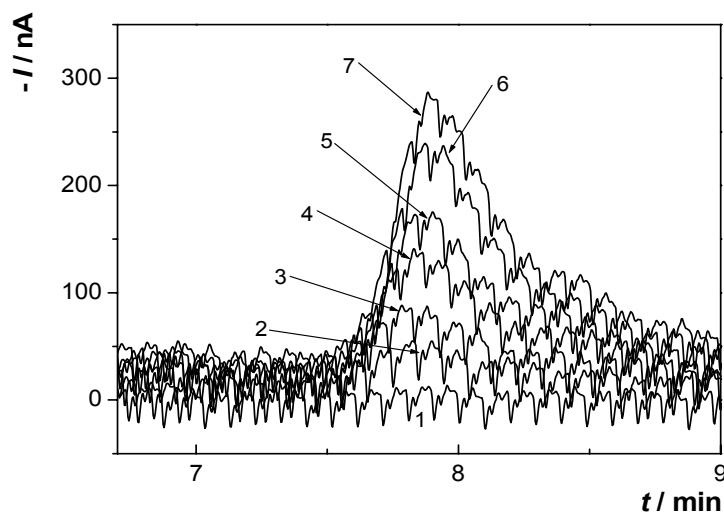
Naměřené kalibrační závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese. Kalibrační přímky byly vyhodnoceny jako závislost výšky píku na koncentraci Carmustinu (Obr. 7.20) a závislost plochy píku na koncentraci Carmustinu (Obr. 7.21). Parametry kalibračních přímek pro stanovení Carmustinu, hodnoty meze stanovitelnosti (L_Q) a meze detekce (L_D) jsou uvedeny v Tab. 7.5 a Tab. 7.6.

Kalibrační závislosti jsou lineární v celém koncentračním rozmezí. Při koncentraci $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ z nejnižšího dosaženého koncentračního řádu byla určena opakovatelnost měření ($n = 10$), statistické zpracování odezev je uvedeno v Tab. 7.7.

Při stanovení bylo dosaženo meze stanovitelnosti $1,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ a meze detekce $4,4 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$.

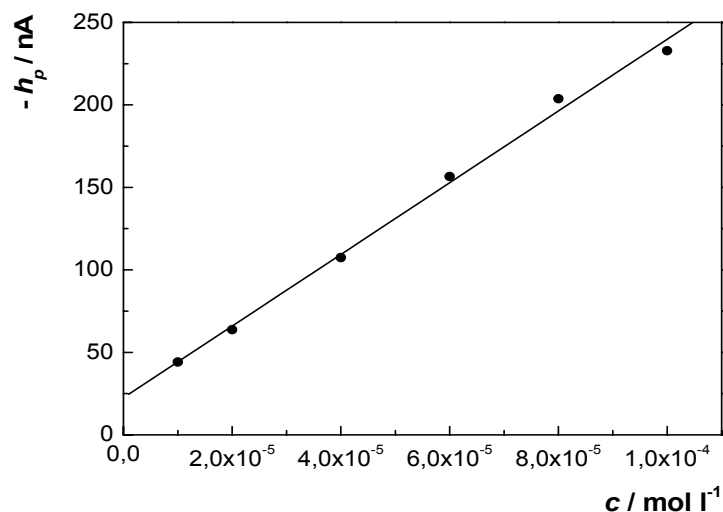
Při stanovení byla také sledována reprodukovatelnost odezvy elektrochemického detektoru s velkoplošnou m-AgSAE na Carmustin v průběhu jednoho měsíce. Měření

byla prováděna jednou týdně vždy s novým meniskem. Naměřená data byla statisticky vyhodnocena. Statistické vyhodnocení naměřených dat je uvedeno v Tab. 7.8. Hodnota relativní směrodatné odchylky 31,7 % vyhodnocená z výšky a 25,3 % vyhodnocená z plochy píku je přijatelná pokud uvažíme, že měření byla prováděna vždy s nově připraveným meniskem a novým nastavením vzdálenosti l mezi elektrodou a ústím výtokové kapiláry.



Obr. 7.19

Chromatogramy Carmustinu měřené metodou HPLC-ED s velkoplošnou m-AgSAE při $E_{det} = -1,2$ V. Mobilní fáze BR pufr o pH 3,0: methanol (60:40); průtoková rychlost 1 ml min^{-1} ; dávkováno $25 \mu\text{l}$, vzdálenost elektrody od ústí výtokové trubičky $0,05 \text{ cm}$, množství rtuti $0,4 \mu\text{l}$. c (Carmustinu) = 0 (1), $1 \cdot 10^{-5}$ (2), $2 \cdot 10^{-5}$ (3), $4 \cdot 10^{-5}$ (4), $6 \cdot 10^{-5}$ (5), $8 \cdot 10^{-5}$ (6), $1 \cdot 10^{-4}$ (7) mol l^{-1} .



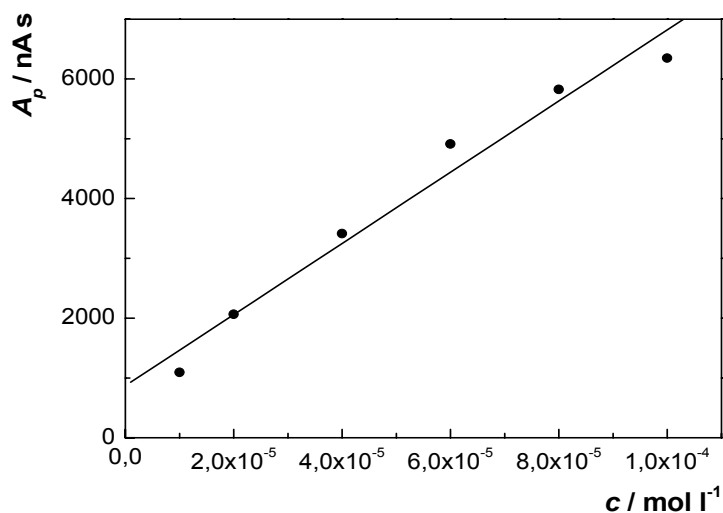
Obr. 7.20

Závislost výšky píku h_p na koncentraci Carmustinu v rozmezí $1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. HPLC-ED s velkoplošnou $m\text{-AgSAE}$ při $E_{\text{det}} = -1,2 \text{ V}$. Mobilní fáze BR pufr o pH 3,0:methanol (60:40); průtoková rychlost 1 ml min^{-1} ; dávkováno $25 \mu\text{l}$, vzdálenost elektrody od ústí výtokové trubičky $0,05 \text{ cm}$, množství rtuti $0,4 \mu\text{l}$.

Tab. 7.5

Parametry kalibrační závislosti vyhodnocené z výšek píku.

c [mol l ⁻¹]	směrnice [nA mol ⁻¹ l]	úsek [nA]	korelační koeficient	L_Q [mol l ⁻¹]	L_D [mol l ⁻¹]
$(1 - 10) \cdot 10^{-5}$	$2,17 \cdot 10^6$	22,4	0,9978	$1,5 \cdot 10^{-5}$	$4,4 \cdot 10^{-6}$



Obr. 7.21

Závislost plochy píku A_p na koncentraci Carmustinu v rozmezí $1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. HPLC-ED s velkoplošnou $m\text{-AgSAE}$ při $E_{\text{det}} = -1,2 \text{ V}$. Mobilní fáze BR pufr o pH 3,0: methanol (60:40); průtoková rychlost 1 ml min^{-1} ; dávkováno $25 \mu\text{l}$, vzdálenost elektrody od ústí výtokové trubičky $0,05 \text{ cm}$, množství rtuti $0,4 \mu\text{l}$.

Tab. 7.6

Parametry kalibrační závislosti vyhodnocené z ploch píku.

c [mol l ⁻¹]	směrnice [nA s mol ⁻¹ l]	úsek [nA s]	korelační koeficient	L_Q [mol l ⁻¹]	L_D [mol l ⁻¹]
$(1 - 10) \cdot 10^{-5}$	$5,95 \cdot 10^7$	868,4	0,9853	$3,3 \cdot 10^{-5}$	$9,8 \cdot 10^{-6}$

Tab. 7.7

Statistické vyhodnocení opakovatelnosti odezvy z deseti stanovení. Dávkováno 25 μl roztoku Carmustinu ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$). HPLC-ED s velkoplošnou m-AgSAE při $E_{\text{det}} = -1,2 \text{ V}$; mobilní fáze BR pufr o pH 3,0: methanol (60:40); průtoková rychlost $1,0 \text{ ml min}^{-1}$, vzdálenost elektrody od ústí trubičky 0,05 cm, množství rtuti 0,4 μl . Vyhodnoceno z výšky h_p a plochy A_p píku.

výška h_p				plocha A_p			
průměr	s	s_r	$L_{1/2}$	průměr	s	s_r	$L_{1/2}$
[nA]	[nA]	[%]	[nA]	[nA s]	[nA s]	[%]	[nA s]
46,5	3,16	6,80	2,82	1327,2	193,8	14,6	159,6

Tab. 7.8

Statistické vyhodnocení reprodukovatelnosti odezvy měřené v průběhu jednoho měsíce. Dávkováno 25 μl roztoku Carmustinu ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$). HPLC-ED s velkoplošnou m-AgSAE při $E_{\text{det}} = -1,2 \text{ V}$; mobilní fáze BR pufr o pH 3,0: methanol (60:40); průtoková rychlost $1,0 \text{ ml min}^{-1}$, vzdálenost elektrody od ústí trubičky 0,05 cm, množství rtuti 0,4 μl . Vyhodnoceno z výšky h_p a plochy A_p píku.

výška h_p				plocha A_p			
průměr	s	s_r	$L_{1/2}$	průměr	s	s_r	$L_{1/2}$
[μA]	[μA]	[%]	[μA]	[$\mu\text{A s}$]	[$\mu\text{A s}$]	[%]	[$\mu\text{A s}$]
2,42	0,74	30,6	0,87	92,4	23,4	25,3	27,7

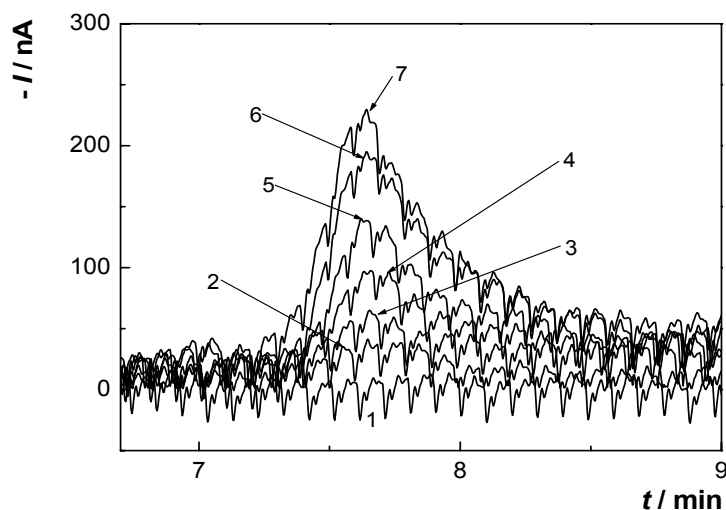
7.2.2 Velkoplošná leštěná stříbrná tuhá amalgamová elektroda

Koncentrační závislost Carmustinu byla proměřena metodou HPLC-ED v prostředí mobilní fáze BR pufru o pH 3,0:methanol v poměru 60:40 (v/v) v rozmezí $(1 - 10) \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$. Příslušné chromatogramy jsou uvedeny na Obr. 7.22. Pro koncentraci nižší než $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ již nebylo možno získané chromatogramy vyhodnotit. Na Obr. 7.22 je opět vidět, že detekce nižších koncentrací je znemožněna vzhledem k poměrně vysokému šumu.

Naměřené kalibrační závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese. Kalibrační přímky byly vyhodnoceny jako závislost výšky píku na koncentraci Carmustinu (Obr. 7.23) a závislost plochy píku na koncentraci Carmustinu (Obr. 7.24). Parametry kalibračních přímek pro stanovení Carmustinu, hodnoty meze stanovitelnosti (L_Q) a meze detekce (L_D) jsou uvedeny v Tab. 7.9 a Tab. 7.10.

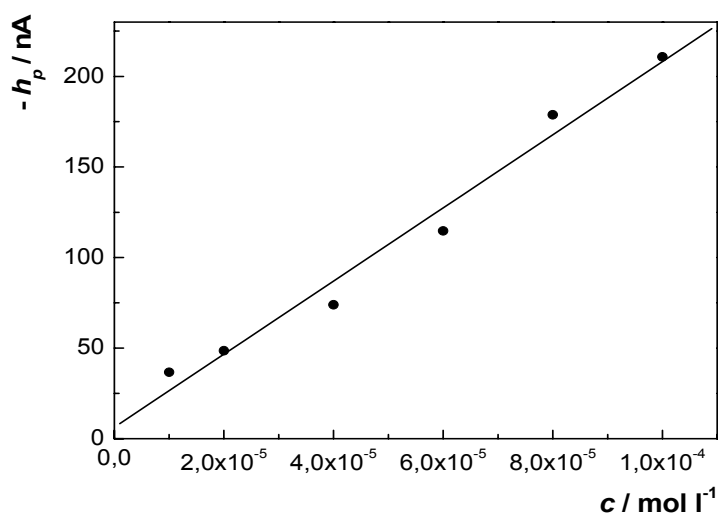
Kalibrační závislosti jsou lineární v celém koncentračním rozmezí. Při koncentraci $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ z nejnižšího dosaženého koncentračního řádu byla určena opakovatelnost měření ($n = 10$), statistické zpracování odezev je uvedeno v Tab. 7.11.

Bylo dosaženo meze stanovitelnosti $1,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ a meze detekce $4,6 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$.



Obr. 7.22

Chromatogramy Carmustinu měřené metodou HPLC-ED s velkoplošnou p-AgSAE při $E_{det} = -1,2$ V. Mobilní fáze BR pufr o pH 3,0: methanol (60:40); průtoková rychlost 1 ml min^{-1} ; dávkováno $25 \mu\text{l}$, vzdálenost elektrody od ústí výtokové trubičky $0,05 \text{ cm}$. c (Carmustinu) = 0 (1), $1 \cdot 10^{-5}$ (2), $2 \cdot 10^{-5}$ (3), $4 \cdot 10^{-5}$ (4), $6 \cdot 10^{-5}$ (5), $8 \cdot 10^{-5}$ (6), $1 \cdot 10^{-4}$ (7) mol l^{-1} .



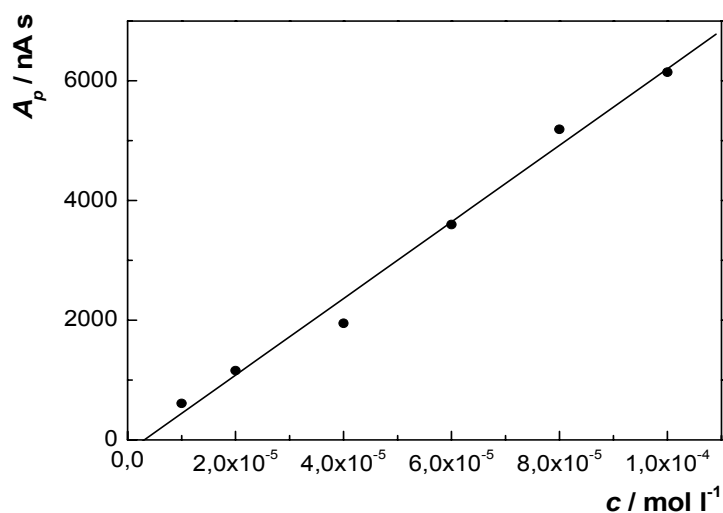
Obr. 7.23

Závislost výšky píku h_p na koncentraci Carmustinu v rozmezí $1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. HPLC-ED s velkoplošnou p-AgSAE při $E_{det} = -1,2$ V. Mobilní fáze BR pufr o pH 3,0: methanol (60:40); průtoková rychlost 1 ml min^{-1} ; dávkováno $25 \mu\text{l}$, vzdálenost elektrody od ústí výtokové trubičky $0,05 \text{ cm}$.

Tab. 7.9

Parametry kalibrační závislosti vyhodnocené z výšek píku.

c [mol l ⁻¹]	směrnice [nA mol ⁻¹ l]	úsek [nA]	korelační koeficient	L_Q [mol l ⁻¹]	L_D [mol l ⁻¹]
$(1 - 10) \cdot 10^{-5}$	$2,02 \cdot 10^6$	6,30	0,9887	$1,5 \cdot 10^{-5}$	$4,6 \cdot 10^{-6}$

**Obr. 7.24**

Závislost plochy píku A_p na koncentraci Carmustinu v rozmezí $1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$ mol l⁻¹. HPLC-ED s velkoplošnou p-AgSAE při $E_{det} = -1,2$ V. Mobilní fáze BR pufr o pH 3,0: methanol (60:40); průtoková rychlost 1 ml min⁻¹; dávkováno 25 μ l, vzdálenost elektrody od ústí výtokové trubičky 0,05 cm.

Tab. 7.10

Parametry kalibrační závislosti vyhodnocené z ploch píku.

c [mol l ⁻¹]	směrnice [nA s mol ⁻¹ l]	úsek [nA s]	korelační koeficient	L_Q [mol l ⁻¹]	L_D [mol l ⁻¹]
$(1 - 10) \cdot 10^{-5}$	$6,40 \cdot 10^7$	-198,2	0,9944	$2,5 \cdot 10^{-5}$	$7,4 \cdot 10^{-6}$

Tab. 7.11

Statistické vyhodnocení opakovatelnosti odezvy z deseti stanovení. Dávkováno 25 μ l roztoku Carmustinu ($c = 2 \cdot 10^{-5}$ mol l^{-1}). HPLC-ED s velkoplošnou p-AgSAE při $E_{det} = -1,2$ V. Mobilní fáze BR pufr o pH 3,0: methanol (60:40); průtoková rychlost 1,0 ml min^{-1} , vzdálenost elektrody od ústí trubičky 0,05 cm. Vyhodnoceno z výšky h_p a plochy A_p píku.

výška h_p				plocha A_p			
průměr	s	s_r	$L_{1/2}$	průměr	s	s_r	$L_{1/2}$
[nA]	[nA]	[%]	[nA]	[nA s]	[nA s]	[%]	[nA s]
47,8	3,09	6,46	2,18	1063,8	157,4	14,8	111,7

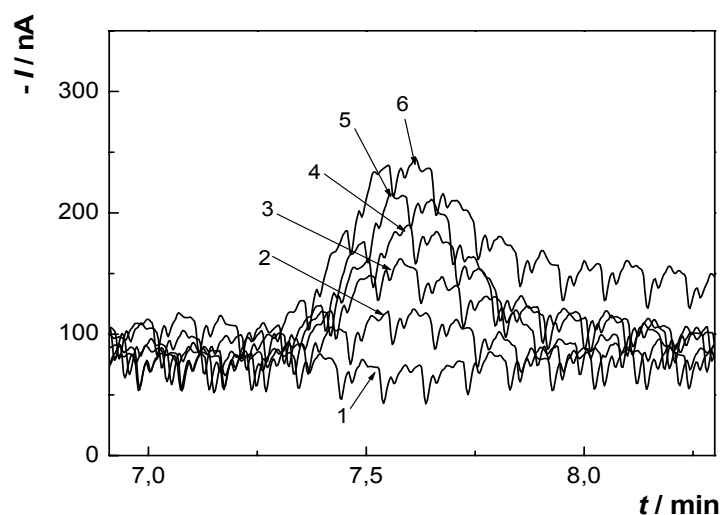
7.2.3 Velkoplošná filmová stříbrná tuhá amalgamová elektroda

Koncentrační závislost Carmustinu byla proměřena metodou HPLC-ED v prostředí mobilní fáze BR pufru o pH 3,0:methanol v poměru 60:40 (v/v) v rozmezí $(2 - 10) \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$. Chromatogramy Carmustinu jsou znázorněny na Obr. 7.25. Pro koncentraci nižší než $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ již nebylo možno získané chromatogramy vyhodnotit v důsledku poměrně vysokého šumu.

Naměřené kalibrační závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese. Kalibrační přímky byly vyhodnoceny jako závislost výšky píku na koncentraci Carmustinu (Obr. 7.26) a závislost plochy píku na koncentraci Carmustinu (Obr. 7.27). Parametry kalibračních přímek pro stanovení Carmustinu, hodnoty meze stanovitelnosti (L_Q) a meze detekce (L_D) jsou uvedeny v Tab. 7.12 a Tab. 7.13.

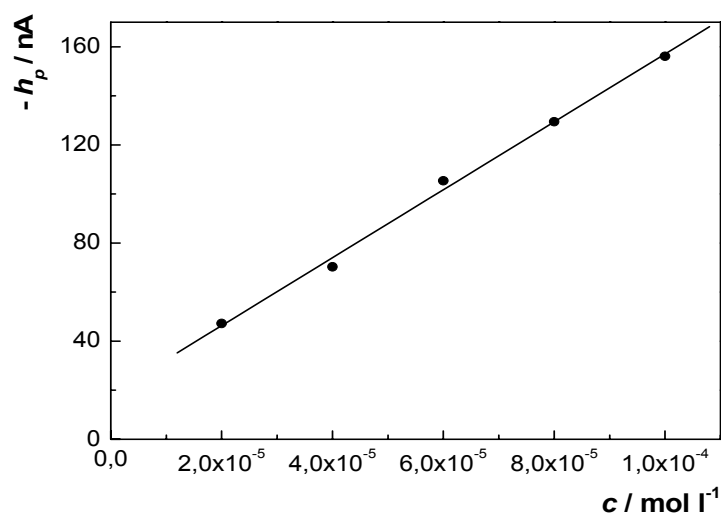
Kalibrační závislosti jsou lineární v celém koncentračním rozmezí. Při koncentraci $2 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ z nejnižšího dosaženého koncentračního řádu byla určena opakovatelnost měření ($n = 10$), statistické zpracování odezev je uvedeno v Tab. 7.14.

Bylo dosaženo meze stanovitelnosti $2,4 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ a meze detekce $7,1 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$.



Obr. 7.25

Chromatogramy Carmustinu měřené metodou HPLC-ED s velkoplošnou MF-AgSAE při $E_{det} = -1,2 \text{ V}$. Mobilní fáze BR pufr o pH 3,0: methanol (60:40); průtoková rychlost 1 ml min^{-1} ; dávkováno $25 \mu\text{l}$, vzdálenost elektrody od ústí výtokové trubičky $0,05 \text{ cm}$. c (Carmustinu) = 0 (1), $2 \cdot 10^{-5}$ (2), $4 \cdot 10^{-5}$ (3), $6 \cdot 10^{-5}$ (4), $8 \cdot 10^{-5}$ (5), $1 \cdot 10^{-4}$ (6) mol l^{-1} .



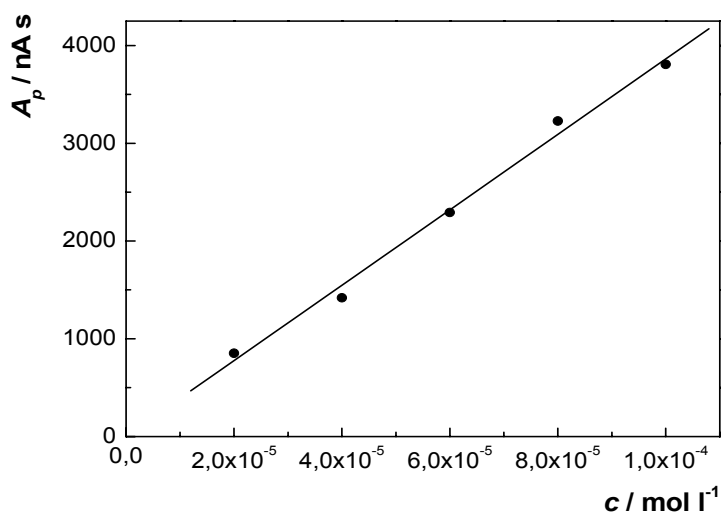
Obr. 7.26

Závislost výšky píku h_p na koncentraci Carmustinu v rozmezí $2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. HPLC-ED s velkoplošnou MF-AgSAE při $E_{det} = -1,2 \text{ V}$. Mobilní fáze BR pufr o pH 3,0: methanol (60:40); průtoková rychlost 1 ml min^{-1} ; dávkováno $25 \mu\text{l}$, vzdálenost elektrody od ústí výtokové trubičky $0,05 \text{ cm}$.

Tab. 7.12

Parametry kalibrační závislosti vyhodnocené z výšek píku.

c [mol l ⁻¹]	směrnice [nA mol ⁻¹ l]	úsek [nA]	korelační koeficient	L_Q [mol l ⁻¹]	L_D [mol l ⁻¹]
$(2 - 10) \cdot 10^{-5}$	$1,38 \cdot 10^6$	18,6	0,9981	$2,4 \cdot 10^{-5}$	$7,1 \cdot 10^{-5}$

**Obr. 7.27**

Závislost plochy píku A_p na koncentraci Carmustinu v rozmezí $2 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$ mol l⁻¹. HPLC-ED s velkoplošnou MF-AgSAE při $E_{det} = -1,2$ V. Mobilní fáze BR pufr o pH 3,0:methanol (60:40); průtoková rychlost 1 ml min⁻¹; dávkováno 25 μ l, vzdálenost elektrody od ústí výtokové trubičky 0,05 cm.

Tab. 7.13

Parametry kalibrační závislosti vyhodnocené z ploch píku.

c [mol l ⁻¹]	směrnice [nA s mol ⁻¹ l]	úsek [nA s]	korelační koeficient	L_Q [mol l ⁻¹]	L_D [mol l ⁻¹]
$(2 - 10) \cdot 10^{-5}$	$3,86 \cdot 10^7$	3,6	0,9963	$3,2 \cdot 10^{-5}$	$9,6 \cdot 10^{-5}$

Tab. 7.14

Statistické vyhodnocení opakovatelnosti odezvy z deseti stanovení. Dávkováno 25 μl roztoku Carmustinu ($c = 2 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$). HPLC-ED s velkoplošnou MF-AgSAE při $E_{\text{det}} = -1,2 \text{ V}$. Mobilní fáze BR pufr o pH 3,0: methanol (60:40); průtoková rychlost $1,0 \text{ ml min}^{-1}$, vzdálenost elektrody od ústí trubičky 0,05 cm. Vyhodnoceno z výšky h_p a plochy A_p píku.

výška h_p				plocha A_p			
průměr	s	s_r	$L_{1/2}$	průměr	s	s_r	$L_{1/2}$
[nA]	[nA]	[%]	[nA]	[nA s]	[nA s]	[%]	[nA s]
46,4	3,27	7,05	7,18	961,4	124,0	12,9	183,6

7.2.4 Klasická meniskem modifikovaná stříbrná tuhá amalgamová elektroda

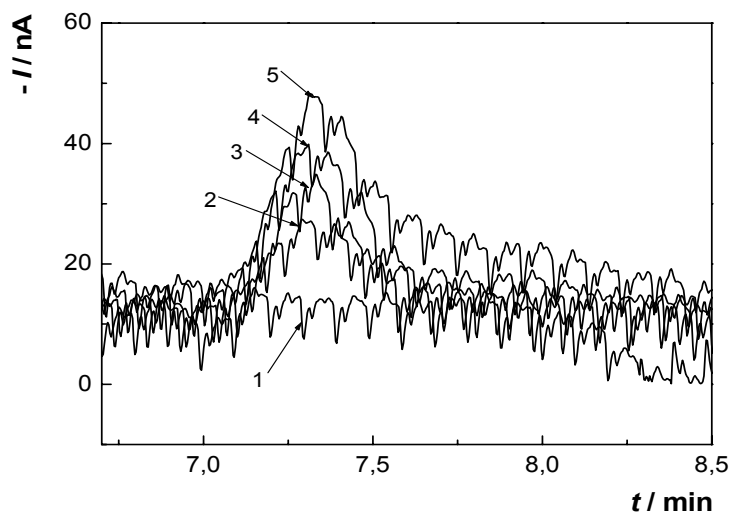
Nakonec byla koncentrační závislost Carmustinu proměřena metodou HPLC-ED na klasické m-AgSAE používané v bakalářské práci s průměrem disku 0,52 mm v prostředí mobilní fáze BR pufru o pH 3,0:metanol v poměru 60:40 (v/v) v rozmezí $(4 - 10) \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$. Příslušné chromatogramy jsou znázorněny na Obr. 7.28. Pro koncentraci nižší než $4 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ již nebylo možno získané chromatogramy vyhodnotit v důsledku relativně vysokého šumu.

Naměřené kalibrační závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese. Kalibrační přímky byly vyhodnoceny jako závislost výšky píku na koncentraci Carmustinu (Obr. 7.29) a závislost plochy píku na koncentraci Carmustinu (Obr. 7.30). Parametry kalibračních přímek pro stanovení Carmustinu, hodnoty meze stanovitelnosti (L_Q) a meze detekce (L_D) jsou uvedeny v Tab. 7.15 a Tab. 7.16.

Kalibrační závislosti jsou lineární v celém koncentračním rozmezí. Při koncentraci $4 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ z nejnižšího dosaženého koncentračního řádu byla určena opakovatelnost měření ($n=10$), statistické zpracování odezev je uvedeno v Tab. 7.17.

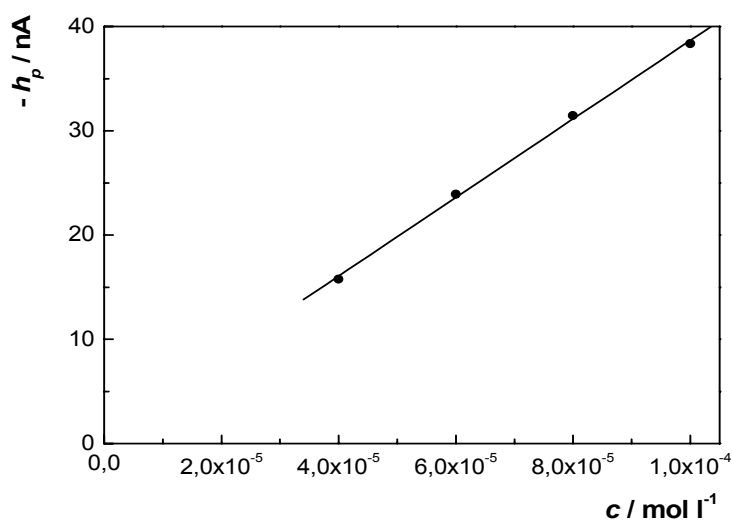
Bylo dosaženo meze stanovitelnosti $3,1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ a meze detekce $9,2 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$.

Z výsledků je patrné, že při měření za použití klasické m-AgSAE s menší plochou ($0,21 \text{ mm}^2$) bylo dosaženo vyšší meze stanovitelnosti a meze detekce než v případě velkoplošné m-AgSAE ($4,76 \text{ mm}^2$). Zároveň u klasické m-AgSAE došlo ke snížení šumu zhruba o 33 %.



Obr. 7.28

Chromatogram Carmustinu měřený metodou HPLC-ED s klasickou *m*-AgSAE při $E_{det} = -1,2$ V. Mobilní fáze BR pufr o pH 3,0: methanol (60:40); průtoková rychlost 1 ml min^{-1} ; dávkováno $25 \mu\text{l}$, vzdálenost elektrody od ústí výtokové trubičky 0,05 cm. c (Carmustinu) = 0 (1), $4 \cdot 10^{-5}$ (2), $6 \cdot 10^{-5}$ (3), $8 \cdot 10^{-5}$ (4), $1 \cdot 10^{-4}$ (5) mol l^{-1} .



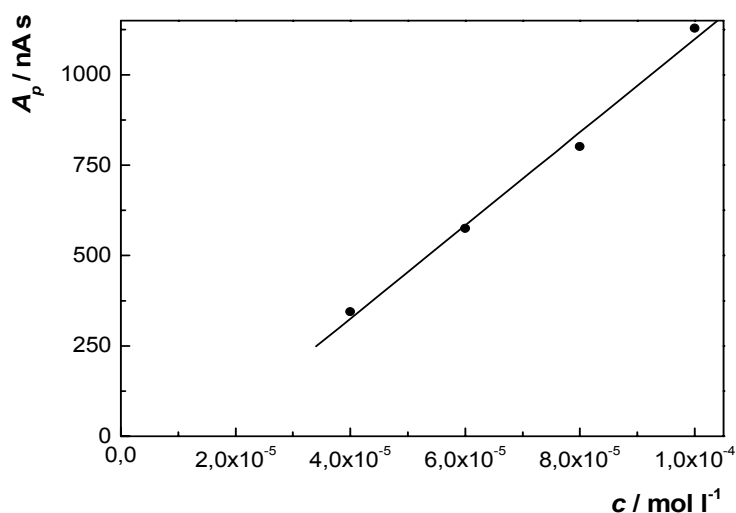
Obr. 7.29

Závislost výšky píku h_p na koncentraci Carmustinu v rozmezí $4 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. HPLC-ED s klasickou *m*-AgSAE při $E_{det} = -1,2$ V. Mobilní fáze BR pufr o pH 3,0: methanol (60:40); průtoková rychlost 1 ml min^{-1} ; dávkováno $25 \mu\text{l}$, vzdálenost elektrody od ústí výtokové trubičky 0,05 cm.

Tab. 7.15

Parametry kalibrační závislosti vyhodnocené z výšek píku.

c [mol l ⁻¹]	směrnice [nA mol ⁻¹ l]	úsek [nA]	korelační koeficient	L_Q [mol l ⁻¹]	L_D [mol l ⁻¹]
$(4 - 10) \cdot 10^{-5}$	$3,77 \cdot 10^5$	1,00	0,9993	$3,1 \cdot 10^{-5}$	$9,2 \cdot 10^{-6}$

**Obr. 7.30**

Závislost plochy píku A_p na koncentraci Carmustinu v rozmezí $4 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-4}$ mol l⁻¹. HPLC-ED s klasickou *m*-AgSAE při $E_{det} = -1,2$ V. Mobilní fáze BR pufr o pH 3,0:methanol (60:40); průtoková rychlost 1 ml min⁻¹; dávkováno 25 μ l, vzdálenost elektrody od ústí výtokové trubičky 0,05 cm.

Tab. 7.16

Parametry kalibrační závislosti vyhodnocené z ploch píku.

c [mol l ⁻¹]	směrnice [nA s mol ⁻¹ l]	úsek [nA s]	korelační koeficient	L_Q [mol l ⁻¹]	L_D [mol l ⁻¹]
$(4 - 10) \cdot 10^{-5}$	$1,29 \cdot 10^7$	-189,9	0,9987	$3,7 \cdot 10^{-5}$	$1,1 \cdot 10^{-5}$

Tab. 7.17

Statistické vyhodnocení opakovatelnosti odezvy z deseti stanovení. Dávkováno 25 μl roztoku Carmustinu ($c = 4 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$). HPLC-ED na klasické m-AgSAE při $E_{\text{det}} = -1,2 \text{ V}$. Mobilní fáze BR pufr o pH 3,0: methanol (60:40); průtoková rychlost $1,0 \text{ ml min}^{-1}$, vzdálenost elektrody od ústí trubičky 0,05 cm. Vyhodnoceno z výšky h_p a plochy A_p píku.

výška h_p				plocha A_p			
průměr	s	s_r	$L_{1/2}$	průměr	s	s_r	$L_{1/2}$
[nA]	[nA]	[%]	[nA]	[nA s]	[nA s]	[%]	[nA s]
15,6	1,15	7,37	0,82	344,4	47,5	13,8	33,7

7.2.5 Koncentrační závislost měřená metodou HPLC-UV

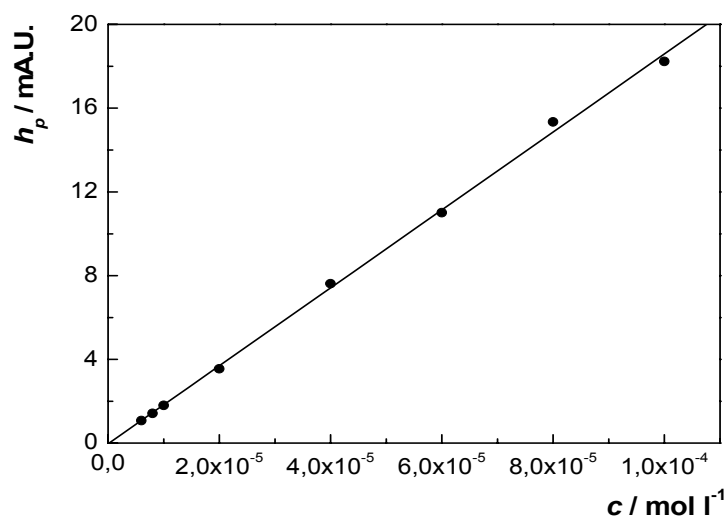
Při měření byl Carmustin detegován při vlnové délce odpovídající absorpčnímu maximu $\lambda_{max} = 230 \text{ nm}$.

Koncentrační závislost Carmustinu byla proměřena metodou HPLC-UV v prostředí mobilní fáze BR pufru o pH 3,0:methanol v poměru 60:40 (v/v) v rozmezí $(2 - 10) \cdot 10^{-5}$ a $(6 - 10) \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$. Pro koncentraci nižší než $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ již nebylo možno získané chromatogramy vyhodnotit.

Naměřené kalibrační závislosti byly zpracovány metodou lineární regrese. Kalibrační přímky byly vyhodnoceny jako závislost výšky píku na koncentraci Carmustinu (Obr. 7.31) a závislost plochy píku na koncentraci Carmustinu (Obr. 7.32). Parametry kalibračních přímek pro stanovení Carmustinu, hodnoty meze stanovitelnosti (L_Q) a meze detekce (L_D) jsou uvedeny v Tab. 7.18 a Tab. 7.19.

Kalibrační závislosti jsou lineární v celém koncentračním rozmezí. Při koncentraci $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ z nejnižšího dosaženého koncentračního řádu byla určena opakovatelnost měření ($n = 10$), statistické zpracování odezev je uvedeno v Tab. 7.20.

Bylo dosaženo meze stanovitelnosti $3,8 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ a meze detekce $1,1 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$.



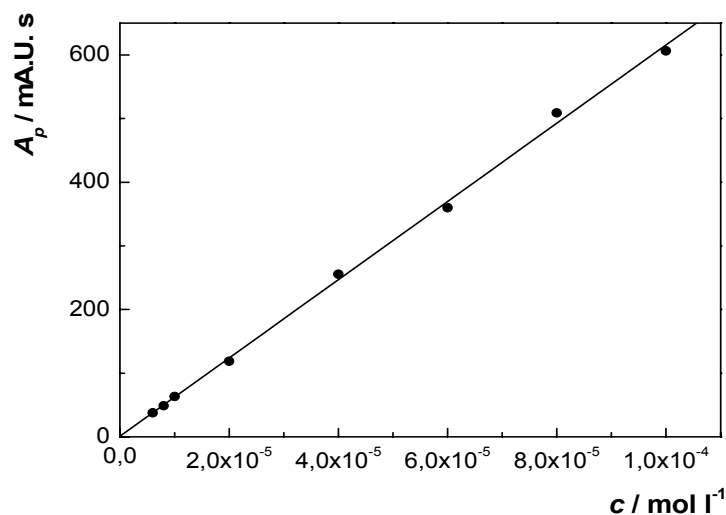
Obr. 7.31

Závislost výšky píku h_p na koncentraci Carmustinu v rozmezí $6 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4}$ mol l⁻¹. HPLC-UV při 230 nm. Mobilní fáze BR pufr o pH 3,0: methanol (60:40); dávkováno 25 μ l; průtoková rychlost 1 ml min⁻¹.

Tab. 7.18

Parametry kalibrační závislosti vyhodnocené z výšek píku.

c [mol l ⁻¹]	směrnice [mA.U. mol ⁻¹ l]	úsek [mA.U.]	korelační koeficient	L_Q [mol l ⁻¹]	L_D [mol l ⁻¹]
$6 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4}$	$1,86 \cdot 10^5$	-0,03	0,9993	$3,8 \cdot 10^{-6}$	$1,1 \cdot 10^{-6}$



Obr. 7.32

Závislost plochy píku A_p na koncentraci v rozmezí $6 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4}$ mol l⁻¹. HPLC-UV při 230 nm. Mobilní fáze BR pufr o pH 3,0: methanol (60:40); dávkováno 25 μ l; průtoková rychlost 1 ml min⁻¹.

Tab. 7.19

Parametry kalibrační závislosti vyhodnocené z ploch píku.

c [mol l ⁻¹]	směrnice [mA.U. s mol ⁻¹ l]	úsek [mA.U. s]	korelační koeficient	L_Q [mol l ⁻¹]	L_D [mol l ⁻¹]
$6 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4}$	$6,15 \cdot 10^6$	0,95	0,9992	$3,9 \cdot 10^{-6}$	$1,2 \cdot 10^{-6}$

Tab. 7.20

Statistické vyhodnocení opakovatelnosti odezvy z deseti stanovení. Dávkováno 25 μl roztoku Carmustinu ($c = 6 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$). HPLC-UV při 230 nm. Mobilní fáze BR pufr o pH 3,0: methanol (60:40); průtoková rychlost 1,0 ml min^{-1} . Vyhodnoceno z výšky h_p a plochy A_p píku.

UV detekce							
výška h_p				plocha A_p			
průměr	s	s_r	$L_{1/2}$	průměr	s	s_r	$L_{1/2}$
[mA.U.]	[mA.U.]	[%]	[mA.U.]	[mA.U. s]	[mA.U. s]	[%]	[mA.U. s]
1,26	0,07	5,16	0,02	38,2	2,41	6,31	1,86

7.2.6 Porovnání elektrochemické a UV detekce

Koncentrační závislosti byly sledovány elektrochemickým detektorem v rozmezí $(1 - 10) \cdot 10^{-5}$ a UV detektorem v rozmezí $6 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$. Porovnání výsledků je uvedeno v Tab. 7.21 (opakovatelnost odezvy) a Tab. 7.22 (L_Q a L_D).

Z Tab. 7.21 je zřejmé, že opakovatelnost odezvy měřená pro nejnižší dosaženou koncentraci je vždy nižší pro výšku píku h_p než pro plochu píku A_p , výrazněji pro elektrochemický detektor.

Mez stanovitelnosti pro UV detektor byla nižší než pro elektrochemický detektor, u elektrochemického detektoru byla nejnižší mez stanovitelnosti dosažena při použití velkoplošné m-AgSAE.

Zvýšení kvality potenciostatu nebo umístění detekční cely do Farradayovy klece by mohlo vést ke snížení šumu a tudíž k dosažení nižších hodnot meze stanovitelnosti.

Tab. 7.21

Porovnání opakovatelnosti stanovení Carmustinu pro nejnižší koncentraci metodou HPLC s ED a UV detekcí.

HPLC-ED				
	h_p [nA]	s_r z h_p [%]	A_p [nA s]	s_r z A_p [%]
velkoplošná m-AgSAE	46,5 ^a	6,80	1327,2	14,6
velkoplošná p-AgSAE	47,8 ^b	6,46	1063,8	14,8
velkoplošná MF-AgSAE	46,4 ^c	7,05	961,4	12,9
klasická m-AgSAE	15,6 ^d	7,37	344,4	13,8
HPLC-UV				
230 nm	h_p [mA.U.]	s_r z h_p [%]	A_p [mA.U. s]	s_r z A_p [%]
	1,26 ^e	5,16	38,2	6,31

^a pro $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, ^b pro $c = 2 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, ^c pro $c = 2 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, ^d pro $c = 4 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$, ^e pro $c = 6 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$

Tab. 7.22

Porovnání L_Q a L_D při stanovení Carmustinu metodou HPLC s ED a UV detekcí.

druh detektoru		L_Q [mol l ⁻¹]	L_D [mol l ⁻¹]
HPLC-ED	velkoplošná m-AgSAE	$1,5 \cdot 10^{-5}$	$4,4 \cdot 10^{-6}$
	velkoplošná p-AgSAE	$1,5 \cdot 10^{-5}$	$4,6 \cdot 10^{-6}$
	velkoplošná MF-AgSAE	$2,4 \cdot 10^{-5}$	$7,1 \cdot 10^{-6}$
	klasická m-AgSAE	$3,1 \cdot 10^{-5}$	$9,2 \cdot 10^{-6}$
HPLC-UV	230 nm	$3,8 \cdot 10^{-6}$	$1,1 \cdot 10^{-6}$

8. Monitorování chemické destrukce Carmustinu

V posledních letech vzrostl v mnoha laboratořích zájem o studium fyzikálních, chemických a biologických vlastností protinádorových látek. Práce s těmito látkami nutně vede ke kontaminaci laboratoře, vytváření laboratorního odpadu obsahující tyto škodlivé látky, a proto je nutné dodržovat zásady bezpečnosti práce s karcinogenními a mutagenními látkami^{51,52}, vyvinout účinné metody k destrukci těchto látek, dekontaminaci laboratoře, laboratorních pomůcek a odpadu⁵³. Tyto metody byly vypracovány v rámci rozsáhlého projektu koordinovaného Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny v Lyonu a musí být kombinovány s vhodnými analytickými metodami pro kontrolu účinnosti destrukce a dekontaminace.

Chemická destrukce Carmustinu je založena na redukci nitrososkupiny v silně kyselém prostředí na aminoderivát a následně v energetické oxidaci a destrukci vzniklého aminoderivátu manganistanem draselným za vzniku CO₂ a H₂O, které nejsou mutagenní. Byly vypracovány metody použitelné k monitorování účinnosti chemické destrukce^{54,55}.

V práci⁵⁴ byla provedena destrukce Carmustinu jednak oxidací manganistanem draselným a jednak denitrozací za použití kyseliny bromovodíkové v prostředí bezvodé kyseliny octové. Účinnost destrukce byla sledována diferenční pulsní polarografií. V druhém případě Amesův test ukázal, že destrukcí vzniká roztok pozitivní na mutagenní aktivitu.

V práci⁵⁵ byla prováděna destrukce *N*-nitrosomočoviny kyselinou bromovodíkovou v prostředí ledové kyseliny octové a kontrolována její účinnost metodou HPLC. Dále zde byly analyzovány extrakty reakčních směsí ¹³C NMR spektroskopii. V případě degradace Carmustinu reakční směs obsahovala jednoduchý denitrozovaný produkt bis(2-chloroethyl)močovinu, *N*-cyklický produkt 1-(2-chloroethyl)imidazolidin a *O*-cyklický produkt *N*-(2-chloroethyl)-4,5-dihydro-2-oxazolamin.

Pro rozklad Carmustinu bylo dále použito fotochemické destrukce pomocí UV záření⁵⁶. Destrukce byla prováděna v reaktoru tvořeném středotlakou rtuťovou výbojkou o výkonu 200 W. Pro kontrolu účinnosti byla použita metoda HPLC s reverzními fázemi s diode-array UV detektorem. Extrakty reakční směsi byly analyzovány metodou GC-MS, ale žádný produkt nebyl identifikován.

Cílem této práce bylo vypracovat elektroanalytické metody (DPV a HPLC-ED) kontroly destrukce Carmustinu při přímé oxidaci manganistanem draselným a po redukci práškovým zinkem a následné oxidaci manganistanem draselným.

V práci bylo postupováno způsobem popsaným v podkapitole 2.4.

8.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Metodou HPLC-ED s velkoplošnou m-AgSAE byl nejprve zanalyzován čerstvě připravený roztok obsahující zásobní roztok Carmustinu v koncentrované kyselině octové, kyselinu sírovou, manganistan draselný a kyselinu šťavelovou a odečtena výška píku h_p^0 naměřeného chromatogramu. Z naměřených chromatogramů vzorků odebraných po hodinových časových intervalech byla odečtena výška píku h_p a z poměru h_p/h_p^0 určen procentuální obsah Carmustinu v destruovaném roztoku. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 8.1, graficky je závislost výšky píku na době destrukce znázorněna na Obr. 8.1. a závislost logaritmu výšky píku na době destrukce na Obr. 8.2. Po 3 hodinách již nebylo možné výšku píku Carmustinu vyhodnotit.

Na Obr. 8.1 je vidět lineární závislost logaritmu výšky píku Carmustinu na době destrukce popsaná rovnicí:

$$\ln h_p = 6,0 - 0,0207t,$$

přičemž hodnota rychlostní konstanty k je $0,0207 \text{ min}^{-1}$. Destrukce Carmustinu patří tedy mezi reakce 1. řádu. Rovnice popisující exponenciální pokles výšky píku v čase je:

$$-h_p = 402,7 \cdot e^{-0,0207t}$$

a hodnota rychlostní konstanty k je $0,0207 \text{ min}^{-1}$. Z hodnoty rychlostní konstanty může být dle vztahu:

$$t_{50\%} = \ln 2 / k$$

vypočten poločas rozpadu, který činí 33,5 min.

Pro kontrolu účinnosti destrukce byla použita metoda standardního přídatku. K 1 ml roztoku odpovídajícímu po destrukci byly postupně přidány přídatky 20, 40, 60, a 80 μl $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ roztoku Carmustinu v koncentrované kyselině octové odpovídající 0,72; 1,44; 2,16 a 2,88 % původně přítomného Carmustinu. Zaznamenané chromatografické křivky ukazuje Obr. 8.3.

Měřením bylo prokázáno, že metoda HPLC-ED je vhodná pro kontrolu účinnosti destrukce a že z původního množství Carmustinu bylo zdestruováno minimálně 99,28 %.

Výsledky měření získané při redukci Carmustinu práškovým zinkem a následné oxidaci manganistanem draselným jsou uvedeny v Tab. 8.1. Po 1,5 hodině již nebylo možné výšku píku Carmustinu vyhodnotit.

Z naměřených dat vyplývá, že chemická destrukce využívající redukci práškovým zinkem před oxidací manganistanem draselným je z důvodu zkrácení celkové doby destrukce výhodnější.

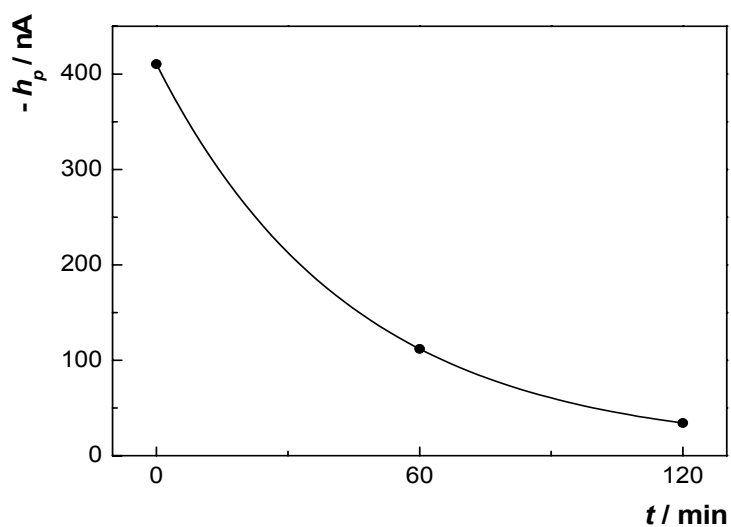
Tab. 8.1

Sledování účinnosti destrukce Carmustinu manganistanem draselným metodou HPLC-ED.

oxidace KMnO_4			redukce Zn a následná oxidace KMnO_4		
doba destrukce [min]	$-h_p$ [nA]	h_p/h_p^0 [%]	doba destrukce [min]	$-h_p$ [nA]	h_p/h_p^0 [%]
0	410,5 ^a	100	0	393,4 ^a	100
60	112,0	27,3	30	102,8	26,1
120	34,3	8,4	60	29,5	7,5
180	– ^b	– ^b	120	– ^b	– ^b

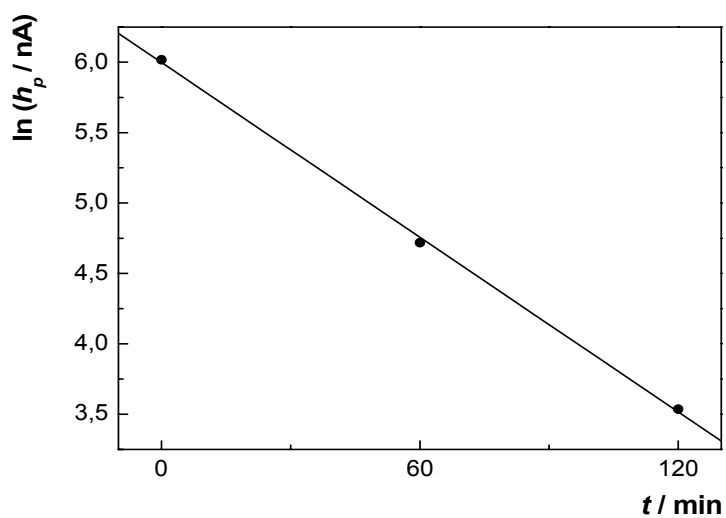
^a – hodnota výšky odpovídající h_p^0

^b – výšku píku nebylo možno vyhodnotit



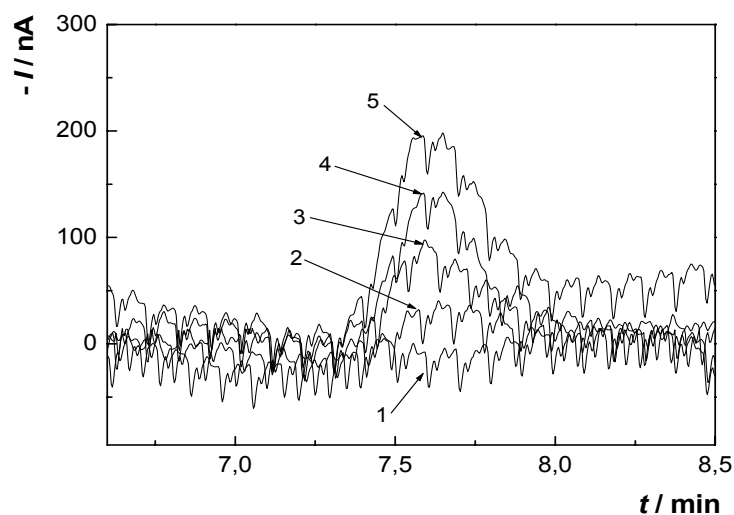
Obr. 8.1

Závislost výšky píku h_p Carmustinu na době destrukce t . HPLC-ED s velkoplošnou m -AgSAE při $E_{det} = -1,2$ V. Mobilní fáze BR pufr: methanol (60:40) o pH BR pufru 3,0; průtoková rychlost 1 ml min^{-1} ; dávkováno $25 \mu\text{l}$; vzdálenost elektrody od ústí trubičky 0,05 cm, množství rtuti $0,4 \mu\text{l}$.



Obr. 8.2

Závislost výšky píku h_p Carmustinu na době destrukce t . HPLC-ED s velkoplošnou m -AgSAE při $E_{det} = -1,2$ V. Mobilní fáze BR pufr: methanol (60:40) o pH BR pufru 3,0; průtoková rychlost 1 ml min^{-1} ; dávkováno $25 \mu\text{l}$; vzdálenost elektrody od ústí trubičky 0,05 cm, množství rtuti $0,4 \mu\text{l}$.



Obr. 8.3

Chromatogramy Carmustinu měřené metodou HPLC-ED s velkoplošnou m-AgSAE při $E_{det} = -1,2$ V. Mobilní fáze BR pufr:methanol (60:40) o pH BR pufru 3,0; průtoková rychlost 1 ml min^{-1} ; dávkováno $25 \mu\text{l}$; vzdálenost elektrody od ústí trubičky 0,05 cm, množství rtuti $0,4 \mu\text{l}$. Základní elektrolyt odpovídající roztoku po destrukci (1) a přidavku Carmustinu o koncentraci $2 \cdot 10^{-5}$ (2), $4 \cdot 10^{-5}$ (3), $6 \cdot 10^{-5}$ (4), $8 \cdot 10^{-5}$ (5) mol l^{-1} .

8.2 Diferenční pulsní voltametrie

Při měření technikou DPV s klasickou m-AgSAE byl na počátku zanalyzován čerstvě připravený roztok obsahující Carmustin v koncentrované kyselině octové, kyselinu sírovou, manganistan draselný a kyselinu šťavelovou a odečtena výška píku h_p^0 naměřeného voltamogramu. V důsledku malému rozdílu potenciálu redukce a úniku základního elektrolytu bylo pH roztoku upraveno 10 mol l⁻¹ roztokem hydroxidu sodného na hodnotu 7,0 dle voltamogramů proměřených v bakalářské práci. Z naměřených voltamogramů vzorků odebraných po hodinových časových intervalech byla odečtena výška píku h_p před a po úpravě pH přidáním roztoku hydroxidu sodného a z poměru h_p/h_p^0 určen procentuální obsah Carmustinu v destruovaném roztoku. Zjištěné výsledky destrukce jsou uvedeny v Tab. 8.2. Po 3 hodinách již nebylo možné výšku píku Carmustinu vyhodnotit.

Při měření byl destruovaný vzorek převeden do polarografické nádoby a zbaven kyslíku pětiminutovým probubláváním dusíkem. Poté byl proveden záznam voltametrické křivky.

Pro kontrolu účinnosti destrukce byla použita metoda standardního přídatku. K 1 ml roztoku odpovídajícímu po destrukci bez úpravy pH byly postupně přidány přídatky 100, 200, 400, 600 a 800 µl 1·10⁻³ mol l⁻¹ roztoku Carmustinu v koncentrované kyselině octové odpovídající 3,6; 7,2; 14,4; 21,6 a 28,8 % původně přítomného Carmustinu. Získané voltamogramy jsou znázorněny na Obr. 8.4.

V druhém měření byly k 1 ml roztoku, jehož pH bylo upraveno roztokem hydroxidu sodného, postupně přidány přídatky 20, 40, 60, 80 a 100 µl 1·10⁻³ mol l⁻¹ roztoku Carmustinu v koncentrované kyselině octové odpovídající 0,72; 1,44; 2,16; 2,88 a 3,60 % původně přítomného Carmustinu. Získané voltamogramy jsou uvedeny na Obr. 8.5.

Z Obr. 8.5 je zřejmé, že po úpravě pH na 7,0 bylo dosaženo o jeden řád nižších hodnot.

Měřením bylo prokázáno, že metoda DPV je vhodná pro kontrolu účinnosti destrukce a že z původního množství Carmustinu bylo zdestruováno minimálně 96,7 % při měření roztoku bez následné úpravy pH a minimálně 99,28 % při měření, kdy bylo pH roztoku upraveno přidáním 10 mol l⁻¹ roztoku hydroxidu sodného na pH 7,0.

Při monitorování destrukce se jako účinnější jeví použití metody HPLC-ED a techniky DPV s úpravou analyzovaného roztoku na hodnotu pH 7,0, kdy bylo v obou případech detekováno stejné, nižší množství Carmustinu v roztoku po destrukci než při použití DPV bez úpravy pH.

Redukce Carmustinu práškovým zinkem a následná oxidace manganistanem draselným nebyla pomocí techniky DPV proměřována.

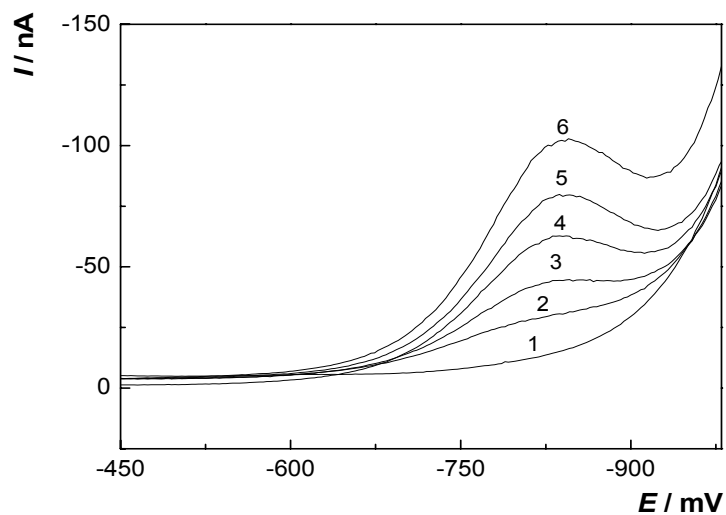
Tab. 8.2

Sledování účinnosti destrukce Carmustinu manganistanem draselným metodou DPV.

bez úpravy pH			úprava pH 10 mol l ⁻¹ NaOH		
doba destrukce [min]	-h _p [nA]	h _p /h _p ⁰ [%]	doba destrukce [min]	-h _p [nA]	h _p /h _p ⁰ [%]
0	160,8	100	0	192,1 ^a	100
60	43,8	27,2	60	49,6	25,8
120	13,7	8,5	120	15,9	8,3
180	– ^b	– ^b	180	– ^b	– ^b

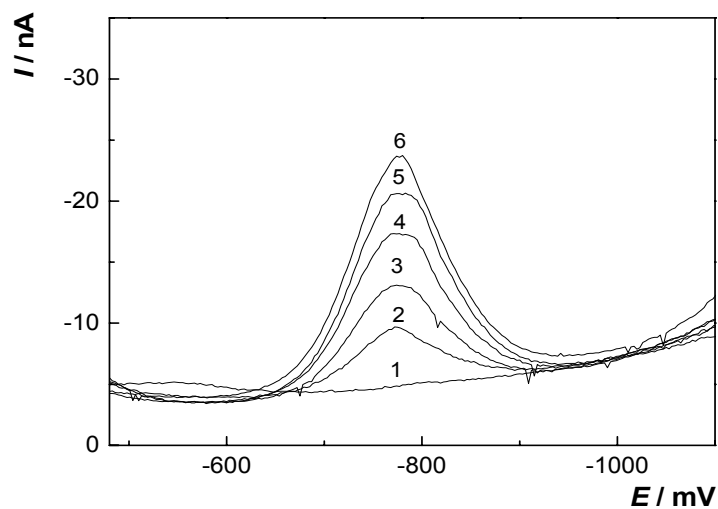
^a – hodnota výšky odpovídající h_p⁰

^b – výšku píku nebylo možno vyhodnotit



Obr. 8.4

Voltamogramy měřené technikou DPV na klasické m-AgSAE po destrukci Carmustinu bez úpravy pH. Roztok po destrukci (1) a přidavcích Carmustinu o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ (2), $2 \cdot 10^{-4}$ (3), $4 \cdot 10^{-4}$ (4), $6 \cdot 10^{-4}$ (5), $8 \cdot 10^{-4}$ (6), mol l^{-1} .



Obr. 8.5

Voltamogramy měřené technikou DPV na klasické m-AgSAE po destrukci Carmustinu a úpravě pH na hodnotu 7,0. Roztok po destrukci (1) a přidavcích Carmustinu o koncentraci $2 \cdot 10^{-5}$ (2), $4 \cdot 10^{-5}$ (3), $6 \cdot 10^{-5}$ (4), $8 \cdot 10^{-5}$ (5), $1 \cdot 10^{-4}$ (6), mol l^{-1} .

9. Závěr

1. Při spektrofotometrickém stanovení bylo zjištěno, že Carmustin v deionizované vodě není možné spektrofotometricky stanovit při koncentracích nižších než $6 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$. Tato hodnota je o řád vyšší než mez detekce L_D dosažená pro techniky DPV a DCV na m-AgSAE a HMDE.
2. Byly vypracovány metody voltametrického stanovení (DCV a DPV) obsahu Carmustinu v lékových formách s využitím HMDE a výsledky porovnány se spektrofotometrickým stanovením dle lékopisu. Obě navržené metody poskytují správné výsledky s hodnotami odchylek od deklarované hodnotami 0,85 % pro DPV a 1,17 % pro DCV. Při stanovení obsahu Carmustinu spektrofotometricky dle lékopisu bylo dosaženo odchylky od deklarované hodnoty nižší, a to 0,3 %.
3. Bylo zjištěno, že průtoková injekční analýza využívající k nadávkování vzorku autosampler není vhodná pro stanovení Carmustinu, jelikož odezvy elektrochemického detektoru byly nereprodukovatelné. Problémy byly pravděpodobně způsobeny používaným autosamplrem, kdy při každém nadávkování vzorku docházelo k nasátí určitého množství vzduchu a detekci přítomného kyslíku.
4. Byla vypracována metoda stanovení Carmustinu metodou průtokové injekční analýzy s elektrochemickou detekcí za použití velkoplošné m-AgSAE a ručního dávkování vzorku. Nalezené optimální podmínky byly: Nosný roztok BR pufr o pH 7,0, průtoková rychlost nosného roztoku $5,5 \text{ ml min}^{-1}$, potenciál vkládaný na pracovní elektrodu $-1,5 \text{ V}$ a množství rtuti $0,4 \text{ }\mu\text{l}$ pro modifikaci m-AgSAE. Po optimalizaci metody byla proměřena kalibrační závislost a dosažena mez stanovitelnosti $7,2 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ a mez detekce $2,2 \cdot 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$.
5. Bylo prostudováno chování Carmustinu v chromatografickém systému s obrácenými fázemi. Byly nalezeny optimální podmínky pro jeho stanovení s elektrochemickou a spektrofotometrickou detekcí. Zjištěné optimální podmínky:

Mobilní fáze připravená smísením BR pufru o pH 3,0 a methanolu v poměru 60:40 (v/v), průtoková rychlost mobilní fáze 1 ml min^{-1} , dávkovaný objem $25 \text{ } \mu\text{l}$. Při měření metodou HPLC-ED byl potenciál detekce $-1,2 \text{ V}$, vzdálenost elektrody od ústí výtokové trubičky $0,05 \text{ cm}$ a množství rtuti na povrchu elektrody u m-AgSAE $0,4 \text{ } \mu\text{l}$. Za těchto podmínek byly proměřeny koncentrační závislosti a stanoveny meze stanovitelnosti a meze detekce na klasické m-AgSAE a velkoplošné elektrodě, lišící se úpravou povrchu (m-AgSAE, p-AgSAE a MF-AgSAE). Dosažené meze stanovitelnosti a meze detekce jsou shrnuty v Tab. 9.1.

Tab. 9.1

Přehled dosažených mezí stanovitelnosti a mezí detekce pro HPLC stanovení Carmustinu s použitím ED a UV detekce.

druh detektoru		$L_D \text{ [mol l}^{-1}\text{]}$	$L_Q \text{ [mol l}^{-1}\text{]}$
HPLC-ED	velkoplošná m-AgSAE	$1,5 \cdot 10^{-5}$	$4,4 \cdot 10^{-6}$
	velkoplošná p-AgSAE	$1,5 \cdot 10^{-5}$	$4,6 \cdot 10^{-6}$
	velkoplošná MF-AgSAE	$2,4 \cdot 10^{-5}$	$7,1 \cdot 10^{-6}$
	klasická m-AgSAE	$3,1 \cdot 10^{-5}$	$9,2 \cdot 10^{-6}$
HPLC-UV	230 nm	$3,8 \cdot 10^{-6}$	$1,1 \cdot 10^{-6}$

- Metodou HPLC-ED a DPV bylo zjištěno, že Carmustin lze zdestruovat během 3 hodin při přímé oxidaci manganistanem draselným a během 1,5 hodiny při předcházející redukci práškovým zinkem. Metodou standardního přidavku bylo zjištěno, že metodou HPLC-ED i DPV, při níž bylo pH roztoku upraveno přidavkem roztoku hydroxidu sodného, bylo odstraněno nejméně 99,28 % Carmustinu.

10. Seznam použité literatury

1. Český lékopis 2005, Doplněk 2006, Grada Publishing 2006.
2. URL: <http://chem.srs.nlm.nih.gov/chemidplus/> [30.4.2007].
3. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Office of information Technology, Division of Data Management and Services, *Approved Drug Products with Therapeutic Equivalence Evaluations Electronic Orange Book (3 Dec 98)*.
4. Klener, P.: *Chemoterapie v komplexní léčbě zhoubných nádorů a hemoblastóz*. Avicenum 1987.
5. Bezpečnostní list Carmustinu (11/24/2006), Praha, Sigma – Aldrich 2006.
URL: <http://www.sigmaaldrich.com> [25.3.2007].
6. URL: <http://www.iarc.fr> [30.4.2007].
7. URL: <http://www.sukl.cz> [25.3.2007].
8. Fleming, A. B.; Saltzman, W. M.: Clin. Pharmacokinet. *41*, 403 (2002).
9. Hampl, F.; Paleček, J.: *Farmakochemie*. VŠCHT Praha 2002, str. 348.
10. Snyckerski, A.; Fijalek, Z.: Chem. Anal. *41*, 1025 (1996).
11. Bartošek, I.; Daniel, S.; Sýkora, S.: J. Pharm. Sci. *67*, 1160 (1978).
12. Krull, I. S.; Strauss, J.: Altex Chromatogram *4*, 10 (1981). CA 95:35107.
13. Li, L.; Zuolian, Z.; Xueyan, B.; Haixia, W.: Zhongguo Yaoshi *8* (10), 824 (2005). CA 147:39550.
14. Xiaodong, M.; Wenbin, Z.; Qin, L.; Dingbiao, Z.; Bainan, X.: Zhonghua Shenjing Waike Jibing Yanjiu Zazhi *5*, 522 (2006). CA 147:79036.
15. Kiffmeyer, T.; Götze, H-J.; Jursch, M.; Lüders, U.: Fresenius J. Anal. Chem. *361*, 185 (1998).
16. Adnan, E-Y.; Cazemiro, M. R.: Pharm. Res. *5* (4), 220 (1988).
17. Smith, R. G.; Blackstock, S. C.; Cheung, L. K.; Loo, T. L.: Am. Chem. *53*, 120, (1981).
18. Hassenbusch, S. J.; Colvin, O. M.; Anderson, J. H.: J. Pharm. Sci. *84*, 840 (1995).
19. Loo, T. L.; Dion, R. L.: J. Pharm. Sci. *54*, 809 (1965).

20. Kráčmar, J.; Kráčmarová, J.: *Československá Farmacie* 37, 149 (1988).
21. Uri, J. V.; Burdash, N.; Farina, D. A.: *Acta Chim. Hung.* 129, 865 (1992).
22. Fredriksson, K.; Lundgren, P.; Landersjö, L.: *Acta Pharm. Suec.* 23, 115 (1986).
23. Laskar, P. A.; Ayres, J. W.: *J. Pharm. Sci.* 66, 1073 (1977).
24. Weinkam, R. J.; Lin, H-S.: *J. Med. Chem.* 22, 1193 (1979).
25. Colvin, M.; Cowens, J. W.; Brundrett, R. B.; Kramer, B. S.; Ludlum, B. D.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60, 515 (1974).
26. Laskar, P. A.; Ayres, J. W.: *J. Pharm. Sci.* 66, 1076 (1977).
27. Tepe, P.; Hassenbusch, S. J.; Bendit, R.; Anderson, J. H.: *J. Neuro-Oncology* 10, 121 (1991).
28. Favier, M.; De Cazanove, F.; Coste, A.; Chrti, N.; Bressolle, F.: *Am. J. Health Syst. Pharm.* 58, 238 (2001).
29. Benvenuto, J. A.; Anderson, R. W.; Kerkof, K.; Smith, R. G.; Loo, T. L.: *Am. J. Hosp. Pharm.* 38, 1914 (1981).
30. Colvin, M.; Hartner, J.; Summerfield, M.: *Am. J. Hosp. Pharm.* 37, 677 (1980).
31. Gonzalves, M. F.; Gayte-Sorbier, A.; Airaudo, C. B.; Verdier, M.: *Clin. Ther.* 14, 821 (1992).
32. URL: <http://www.europarl.eu.int/meetdocs/2004-2009/documents/pr/585/585664/585664cs.pdf>
33. Fisher, A. E.; Swain, G. M.: *Electrochem. Soc.* 152, B369 (2005).
34. Barek, J.; Fischer, J.; Navrátil, T.; Pecková, K.; Yosypchuk, B.; Zima, J.: *Electroanalysis*, 19, 2003 (2007).
35. Mikkelsen, O.; Schroder, K. H.: *Analyst* 125, 2163 (2000).
36. Bas, B.; Kowalsi, Z.: *Electroanalysis* 14, 15 (2003).
37. Yosypchuk, B.; Novotný, L.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 32, 141 (2002).
38. Novotný, L.; Yosypchuk, B.: *Chem. Listy* 94, 1118 (2000).
39. Barek, J.: *Možnosti inovací v elektroanalytické chemii*. Praha 2006.

40. Ciszowska, M.; Donten, M.; Stojek, Z.: *Anal. Chem.* 66, 4112 (1994).
41. Daňhel, A.; Pecková, K.; Čížek, K.; Barek, J.; Zima, J.; Yosypchuk, B.; Navrátil, T.: *Chem. Listy* 101, 144 (2007).
42. Yosypchuk, B.; Novotný, L.: *Chem. Listy* 96, 756 (2002).
43. Barek, J.; Opekar, F.; Štulík, K.: *Elektroanalytická chemie*. Praha, Nakladatelství Karolinum 2005.
44. Sýkora, V.; Zátka, V.: *Průruční tabulky pro chemiky*. SNTL Praha 1967.
45. Deylová, D.: Diplomová práce, Univerzita Karlova, Praha 2008.
46. Inczédy, J.; Lengyel, T.; Ure, A. M.: *Compendium of analytical nomenclature* (definitive rules 1997); Blackwell Science 1998.
47. Vrzalová, L.: Bakalářská práce, Univerzita Karlova, Praha 2007.
48. Help (verze 4.0), Merck-Hitachi Model D-7000, Chromatography Data Station Software, USA, 1994 – 2000.
49. Daňhel, A.; Shiu, K. K.; Yosypchuk, B.; Barek, J.; Pecková, K.; Vyskocil, V.: *Electroanalysis*, v tisku.
50. Štulík, K.; Pacáková, V.: *Elektroanalytická měření v proudících kapalinách*. SNTL Praha 1985.
51. *Směrnice ministerstva zdravotnictví no. 64 o hygienických zásadách pro práci s chemickými karcinogeny*. Hygienické předpisy, Vol. 56/1984. Avicenum – Zdravotnické nakladatelství, Praha 1984.
52. Montesano, R. (ed.): *Handling Chemical Carcinogens in the Laboratory. Problem of Safety*. IARC Scientific Publication No. 33. IARC, Lyon 1979.
53. Castegnaro, M. (ed.): *Laboratory Decontamination and Destruction of Carcinogens in Laboratory Wastes: Some Antineoplastic Agents*. IARC Scientific Publication No. 73, IARC, Lyon 1985.
54. Barek, J.; Zima, J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 54, 361 (1989).
55. Lunn, G.; Sansone, E. B.; Andrews, A. W.; Hellwig, L. C.: *J. Pharm. Sci.* 78, 652 (1989).

56. Lunn, G.; Rhodes, S. W.; Sansone, E. B.; Schmuff, N. R.: J. Pharm. Sci. 83, 1289 (1994).